

BILIÄRES GLYKOPROTEIN (BGP I)
- REINIGUNG, NACHWEIS
UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Petra Stieber

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0031

Aus der Medizinischen Klinik II Klinikum Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

BILIÄRES GLYKOPROTEIN (BGP I) - REINIGUNG, NACHWEIS
UND KLINISCHE BEDEUTUNG

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Petra Stieber
aus München
München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Lamerz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1986

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	EINLEITUNG	1
2	CEA UND SEINE KREUZREAGIERENDEN ANTIGENE	3
2.1	Das karzinoembryonale Antigen	3
2.1.1	Vorkommen	3
2.1.2	Lokalisation	4
2.1.3	Physikochemische Eigenschaften	4
2.1.4	Klinische Anwendung	5
2.2	Die mit dem CEA kreuzreagierenden Antigene	6
2.2.1	NCA	8
2.2.2	NCA ₂	10
2.2.3	BGP I	11
2.2.3.1	Vorkommen und Lokalisation	11
2.2.3.2	Physikochemische Eigenschaften	12
2.2.3.3	Nachweismethoden	13
3	METHODIK	14
3.1	Analytische Verfahren	14
3.1.1	Gesamt-Eiweiß	14
3.1.2	Immunelektrophorese	14
3.1.3	Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY	14
3.1.4	Radioimmunoassay	15

3.1.4.1	Prinzip	15
3.1.4.2	Durchführung	17
3.1.4.2.1	Markierung	17
3.1.4.2.2	Reinigung des markierten Proteins	18
3.1.4.2.3	Antikörperverdünnungskurve (Testung des 1. Antikörpers)	19
3.1.4.2.4	Standard - Inhibitionskurve	21
3.1.4.2.5	BGP - Radioimmunoassay	22
3.2	Präparative Verfahren	25
3.2.1	Galle - Extraktion	25
3.2.2	Zentrifugation	26
3.2.3	Dialyse	26
3.2.4	Einengung	27
3.2.5	Lyophilisation bzw. Einfrieren	28
3.2.6	Säulenchromatographie	28
3.2.6.1	Ionen-Austauschchromatographie	28
3.2.6.2	Gelfiltration	29
3.2.6.3	Affinitätschromatographie	29
3.2.6.3.1	Kohlenhydratspezifische Bindung mit CON A - SEPHAROSE	29
3.2.6.3.2	IgG - Bindung mit PROTEIN A - SEPHAROSE CL-4B	30
3.2.6.3.3	Immunadsorptions - Chromatographie	31
3.2.6.4	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	33
3.3	Herstellung von Antiseren	34
3.3.1	Immunisierung	34
3.3.2	Absorption und Reinigung der Antiseren	35
3.4	Berechnungen	37
3.4.1	Markierung	37
3.4.2	Antikörperverdünnungskurve	37
3.4.3	Standard-Inhibitionskurve / Scatchard-Plot	38

4	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	40
4.1	Zur Methodik verwandtes Material	40
4.1.1	BGP - Quelle	40
4.1.2	Antiseren	41
4.1.3	RIA - Standard	41
4.2	Untersuchtes Patientengut	41
4.2.1	Normalkollektiv	42
4.2.2	Patienten mit nicht malignen Erkrankungen	42
4.2.3	Patienten mit malignen Erkrankungen	43
4.2.4	Untersuchung von Galleproben	44
5	ERGEBNISSE	45
5.1	Methodischer Teil	45
5.1.1	Galle - Extraktion	45
5.1.2	Reinigung des Antigens	48
5.1.3	Charakterisierung von BGP	56
5.1.4	Herstellung von Antiseren	58
5.1.5	Radioimmunoassay	64
5.1.5.1	Markierung	64
5.1.5.2	Antikörperverdünnungskurve	65
5.1.5.3	Standard - Inhibitionskurve	69
5.2	Klinischer Teil	70
5.2.1	BGP - Spiegel unterschiedlicher Kollektive	70
5.2.1.1	BGP - Spiegel bei Normalpersonen	70
5.2.1.2	BGP - Spiegel bei Personen mit benignen Erkrankungen des Gastriontestinaltraktes	70
5.2.1.3	BGP - Spiegel bei Personen mit malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	82
5.2.1.4	BGP - Spiegel in der Galle	91

5.2.2	Vergleich der BGP - Spiegel der einzelnen Untersuchungskollektive	91
5.2.3	Korrelation von BGP mit anderen gemessenen Parametern	95
6	DISKUSSION	100
6.1	Methodischer Teil	100
6.1.1	Extraktion und Reinigung des Antigens	100
6.1.2	Herstellung der Antiseren	104
6.1.3	Radioimmunoassay	105
6.1.3.1	Markierung	105
6.1.3.2	Antikörperverdünnungskurve	106
6.1.3.3	Standardinhibitionskurve und Testansatz	106
6.2	Klinischer Teil	108
6.2.1	BGP-Spiegel bei unterschiedlichen Kollektiven	108
6.2.1.1	BGP-Spiegel bei Normalpersonen	108
6.2.1.2	BGP-Spiegel bei benignen Erkrankungen	108
6.2.1.3	BGP-Spiegel bei malignen Erkrankungen	109
6.2.1.4	BGP-Spiegel in der Galle	110
6.2.2	BGP als Cholestase-Parameter	110
7	ZUSAMMENFASSUNG	120
8	LITERATURVERZEICHNIS	123
9	LEBENS LAUF	140

1. EINLEITUNG

Auf der Suche nach einem immundiagnostischen Parameter zur Erfassung eines Tumors sowie zur Bestimmung seiner Ausdehnung und Lokalisation gewinnen in den letzten Jahren Tumormarker immer mehr an Bedeutung. Es handelt sich dabei um Substanzen, die entweder von der Tumorzelle selbst produziert werden, oder deren Produktion durch das maligne Wachstum stimuliert wird. Von allen diesen tumorassoziierten Antigenen, die auf ihre klinische Bedeutung und ihre praktische Brauchbarkeit als Tumormarker in der letzten Zeit überprüft worden sind, hat sich das karzinoembryonale Antigen CEA am besten bewährt.

Den kanadischen Autoren GOLD und FREEDMAN (25) gelang es 1965 erstmals, mittels OUCHTERLONY-Doppeldiffusion (57) in Extrakten aus Adenokarzinomen des Dickdarms dieses Glykoprotein immunologisch nachzuweisen. Entgegen der ursprünglichen Annahme der Erstbeschreiber wurde jedoch nach Entwicklung hochempfindlicher immunologischer Nachweismethoden festgestellt, daß das karzinoembryonale Antigen CEA auch in vielen von Tumorgewebe unabhängigen Flüssigkeiten und Geweben vorkommt (Neville, Lawrence / 55). In der Absicht, die Tumorspezifität des CEA-Radioimmunoassay zu erhöhen, versuchte man daraufhin, das Anti-CEA-Serum mit Extrakten verschiedener Normalgewebe zu absorbieren. Trotzdem fanden sich weiterhin zum Teil stark erhöhte CEA-Spiegel bei nicht malignen Erkrankungen. Man erklärte sich diese Tatsache mit der Existenz von kreuzreagierenden Antigenen, die zwar mit dem karzinoembryonalen Antigen zumindest eine Antigendeterminante gemeinsam haben und so mit Antikörpern reagieren können, die gegen CEA gerichtet sind, ansonsten aber aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und weiterer Determinanten eigenständig sind.

Da sich auch erhöhte CEA-Spiegel bei benignen Lebererkrankungen fanden und einige dieser Krankheiten mit dem

klinischen Bild einer Cholestase verbunden waren, kam man auf die Idee, Galleflüssigkeit auf mit CEA kreuzreagierende Antigene zu untersuchen. Tatsächlich gelang es SVENBERG (74) 1976 erstmals, ein eigenständiges Glykoprotein zu isolieren, das er biliäres Glykoprotein BGP I nannte. In weiteren Untersuchungen versuchte er mit Hilfe eines BGP-Radioimmunoassay, den Zusammenhang zwischen Cholestase und erhöhten BGP-Serumspiegeln darzulegen (78).

Die Ziele der hier vorliegenden Arbeit waren:

1. die Isolierung des biliären Glykoproteins BGP aus Galleflüssigkeit;
2. die Reinigung des Antigens;
3. die Gewinnung eines monospezifischen Anti-BGP-Serums;
4. die Entwicklung eines BGP-Radioimmunoassay;
5. die radioimmunologische Bestimmung des BGP-Serumspiegels bei Normalpersonen und Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen;
6. die Beurteilung einer möglichen klinischen Relevanz des BGP.

2. CEA UND SEINE KREUZREAGIERENDEN ANTIGENE

2.1 Das karzinoembryonale Antigen

2.1.1 Vorkommen

Das karzinoembryonale Antigen CEA ist ein Glykoprotein, das 1965 erstmals von den kanadischen Autoren GOLD und FREEDMAN (25) aus Adenokarzinomen des Dickdarms isoliert wurde. Mit Hilfe der Gelpräzipitation gelang es den Erstbeschreibern, das Antigen in Extrakten aus gastrointestinalen Tumoren sowie in fetalem Darm-, Leber- und Pankreasgewebe, nicht jedoch in anderen Tumoren oder normaler Schleimhaut nachzuweisen. Nach Entwicklung sehr sensibler immunologischer Bestimmungsmethoden wie dem Radioimmunoassay konnte jedoch die von GOLD und FREEDMAN angenommene Organspezifität des CEA nicht bestätigt werden.

KHOO et al. (34) fanden zwar im Radioimmunoassay ebenfalls die höchsten CEA-Konzentrationen in Tumoren des Gastrointestinaltraktes und deren Metastasen, konnten aber das Antigen auch in anderen Tumoren und - wenn auch in sehr geringer Konzentration - sogar in Normalgewebe nachweisen.

Nach vielen sich anschließenden Untersuchungen konnte belegt werden, daß es sich bei dem CEA um eine fast ubiquitär vorkommende Substanz handelt, so daß die tumorimmunologische Bedeutung dieses Antigens mehr im Nachweis quantitativer als qualitativer Unterschiede liegt.

Klinische Relevanz erlangte das karzinoembryonale Antigen, nachdem es erstmals 1969 durch den Radioimmunoassay von THOMSON et al. (87) auch im Blut Krebskranker nachgewiesen werden konnte.

2.1.2 Lokalisation

Eine wichtige Frage, auch im Hinblick auf eine eventuelle klinische Anwendung des CEA-Tests, ist die der zellulären Lokalisation dieses Antigens. Mittels immunfluoreszenzoptischer Methoden konnten V.KLEIST et al.(38) sowie DENK et al.(14) CEA auf der lumenwärts gerichteten Oberfläche von Adenokarzinom-Schleimhautzellen lokalisieren. Nach neueren Untersuchungen stellte sich heraus, daß sich das karzinoembryonale Antigen lediglich bei Mammakarzinomen im Zytoplasma fein- bis grobkörnig anreichert (26), während es bei Intestinaltumoren die Zelle anscheinend leichter verlassen kann und sich in der Glykokalix der Tumorzelle anlagert (31).

Bei kürzlich erfolgten ultrastrukturellen Untersuchungen zeigte sich, daß das CEA aus dem Golgi-Apparat hervorkommt, zur äußeren Zellmembran transportiert und von dort an die umgebende Zellflüssigkeit abgegeben wird. Bei diesem Vorgang findet dann auch eine CEA-Anreicherung in dem "outer-cell-coat", der Glykokalix, statt (31).

2.1.3 Physikochemische Eigenschaften

CEA ist ein sehr resistentes und in 1 M Perchlorsäure lösliches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180000 + 20000 D (42,81,10). Der Sedimentationskoeffizient liegt nach KRUPPEY et al.(42) zwischen 6,9 und 8,0 S. In der Elektrophorese zeigt CEA eine beta-Mobilität. TERRY und Mitarbeiter bestimmten einen Kohlehydratanteil von 50 - 75 %, entsprechend einem Proteinanteil von 25 - 50 % (81,82). Dieselbe Arbeitsgruppe ermittelte folgende N-terminale Aminosäuresequenz: Lys-Leu-Thr-Ile-Glu-Ser-Thr-Pro-Phe-Asn-Val-Ala-Glu-Gly-Lys-Glu-Val-Leu-Leu-Val-His-Asn-Leu. Nach heutigen Erkenntnissen liegen die immundominanten Antigen determinanten mehr auf dem Pro-

teinanteil des CEA-Moleküls, der sich im Vergleich zu den Kohlehydratketten durch eine erstaunlich konstante Zusammensetzung auszeichnet (88,11). Immunchemisch sind bislang wenigstens fünf verschiedene antigene Determinanten (Epitope) unterschieden worden, von denen mindestens 2 kreuzreagierende Antigene mit anderen verwandten Proteinen darstellen (91).

CEA wird wie die meisten anderen Glykoproteine in der Leber abgebaut. Wie THOMAS et al.(84) kürzlich darlegen konnten, wird das karzinoembryonale Antigen zunächst von den Kupffer-Zellen aus dem Blut aufgenommen und zu den Hepatozyten transportiert. Nach erfolgter Endozytose findet dann der weitere Katabolismus in den Lysosomen statt. Durch diesen Mechanismus der CEA-Ausscheidung wird deutlich, welch entscheidenden Einfluß die Glykoprotein- Clearance- Funktion der Leber auf die Höhe der CEA-Serumkonzentration hat und daß somit die diagnostische Sicherheit des CEA-RIA durch Gallenwegsobstruktion oder Cholestase jeglicher Pathogenese beeinträchtigt werden kann.

2.1.4 Klinische Anwendung des CEA

Für die gegenwärtig gebräuchlichen CEA-Radioimmunoassays wurde von den National Institutes of Health NIH die oberste Normgrenze des Plasma-CEA-Spiegels bei 2,5 ng/ml festgelegt.

Generell muß gesagt werden, daß der CEA-RIA nicht als Screening-Methode zur Krebsfrüherkennung geeignet ist, da die diagnostische Spezifität und Sensitivität zu gering ist. Dennoch können CEA-Serumkonzentrationen, die ein Vielfaches der Obergrenze des Normalbereichs überschreiten, ein deutlicher Hinweis auf eine maligne Erkrankung sein. Im Rahmen der Erstdiagnose von Kolon-, Rektum- und Pankreaskarzinomen sowie von medullären Schilddrüsenkarzinomen kann die CEA-Bestimmung als ergänzender Test wertvolle Hinweise liefern. Die wohl größte Bedeutung des CEA-RIA liegt jedoch in der Erkennung von Tumorrezidiven im postoperativen Verlauf von Kolon-, Rektum- und Mammakarzinomen, wobei vor allem im ersten

Jahr nach der Operation bei vermeintlich kurativ operierten Patienten Verlaufskontrollen im Abstand von 6 Wochen bis 3 Monaten empfohlen werden. Ein postoperativ ansteigender CEA-Spiegel kann häufig das erste Zeichen einer erneuten Tumorprogredienz sein und zu einer second look-Operation veranlassen. Bei Mammakarzinomen kann mit Hilfe des CEA-RIA das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie beobachtet werden: ansteigende Werte sprechen für eine Chemotherapie-Resistenz, wobei jedoch gleichbleibende Konzentrationen eine Tumor-Progression nicht ausschließen.

CEA-Spiegel über 2,5 ng/ml finden sich jedoch nicht nur bei malignen Prozessen, sondern auch bei Patienten mit benignen Tumoren oder entzündlichen Krankheitsbildern wie Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Pankreatitis und Hepatitis. Auch Raucher und sogar Patienten mit Frischzellentherapie weisen erhöhte CEA-Werte auf, wodurch die diagnostische Spezifität des CEA-RIA in manchen Fällen stark herabgesetzt werden kann.

2.2 Die mit dem CEA kreuzreagierenden Antigene

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es Substanzen, die mit dem CEA-Molekül zumindest teilidentisch sind, d.h. immunreaktive Determinanten besitzen, die mit dem karzinoembryonalen Antigen mehr oder minder nahe verwandt sind und somit einen kreuzreagierenden Effekt besitzen. Im Laufe der Jahre wurden etliche solcher kreuzreagierenden Antigene entdeckt, die sich jedoch bei genauerer Untersuchung häufig als identisch erwiesen.

In Tabelle 1 sind die wesentlichen Antigene aufgeführt, die sich deutlich von CEA unterscheiden, daneben aber eine oder möglicherweise mehrere gemeinsame Antigendeterminanten besitzen.

<u>NAME</u>	<u>MG(D)</u>	<u>KH(%)</u>	<u>ELEKTROPHORETISCHE</u> <u>MOBILITÄT</u>	<u>REF</u>
NCA ₁	60000- 110000	40	beta	17
TEX	110000	35	beta	33
NCA ₂	160000	50	beta	6
NFA ₂	160000- 170000		beta	50
MEKONIUM ANTIGEN	185000		alpha	60
NFA ₁	20000- 30000	13	beta	44
BGP I	80000	40	alpha ₁	74

TABELLE 1: Mit CEA kreuzreagierende Antigene

2.2.1 NCA

NCA (nonspecific crossreacting antigen) ist das erste und bedeutendste mit CEA kreuzreagierende Antigen. Es wurde erstmals 1972 von V.KLEIST et al.(37,35,39) sowie gleichzeitig als NGP (normal glycoprotein) von MACH und PUSTASZERI (49) beschrieben.

NCA kommt vorwiegend in Extrakten verschiedener menschlicher Tumoren und Normalgewebe (hauptsächlich Milz,Lunge,Colon/ 37) vor, ferner in Zellen der myeloischen Reihe (Granulozyten, Monozyten, Neutrophile/ 7), im Serum von Gesunden sowie von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen.

NCA weist wie CEA elektrophoretisch beta-Mobilität auf, hat aber ein niedrigeres Molekulargewicht (50000 - 60000) und einen niedrigeren Sedimentationskoeffizienten (3,8 S). Es hat einen geringeren Kohlehydratanteil (30-35%, bestehend aus Fucose, Hexose, N-Acetyl-glucosamin, N-Acetylgalactose und N-Acetyl-neuraminsäure) sowie eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie CEA mit einer weitgehend identischen Aminosäuresequenz der ersten 24 aminoterminalen Aminosäuren bis auf den Austausch von Valin (CEA) gegen Alanin in Position 21 (67,28,17). Bis vor kurzem war man der Meinung, daß Methionin nur in NCA vorkommt, so daß der Nachweis dieser Aminosäure in CEA-Präparationen auf eine Kontamination mit NCA verdächtig ist (17). Wie die neuesten Untersuchungen von ABUHARFEIL und Mitarbeitern (1) jedoch zeigen, ist das Vorkommen von Methionin in CEA-Präparationen nicht auf NCA, sondern auf α_1 -Antitrypsin- und α_1 -Antichymotrypsin-ähnliche Proteine zurückzuführen, die automatisch mitextrahiert und bei allen Reinigungsschritten mitisoliert werden.

Dadurch, daß viele Untersuchergruppen das non specific cross-reacting antigen isoliert, es jedoch erst viel später als ein und dasselbe Antigen erkannt haben, gibt es etliche Synonyma für NCA, so z.B. CEX, CCEA₂, CCA-III, β_{2E} und auch TEX (67,28 33,5,36).

Wie bereits mehrfach erwähnt, unterscheidet sich NCA nur sehr wenig von CEA, doch neben den mit CEA-Determinanten identischen kreuzreagierenden Determinanten besitzt NCA noch mindestens eine spezifische Antigendeterminante, so daß ein polyklonales Anti-NCA-Serum durch Absorption mit CEA spezifisch gemacht werden kann.

NCA läßt sich immunfluoreszenzoptisch in Normal- und Tumorgewebe von Colon, Magen und Lunge in Verbindung mit der Zellmembran nachweisen. Wie CEA kommt auch NCA in fetalen Organen vor (GADLER et al./ 23), wobei die höchsten Konzentrationen in Colon, Leber, Milz und Plazenta gefunden wurden. Besondere Bedeutung kommt dem Nachweis von NCA im Zytoplasma von normalen und neoplastischen neutrophilen Granulozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, Makrophagen und Monozyten zu, weshalb es auch als normales myeloisches Differenzierungsantigen angesehen wird (PATTENGAL et al./ 58; BURTIN et al./ 7). Auch bei Gesunden konnten NCA-Serumspiegel gefunden werden, die auf die Sekretion von NCA aus myeloischen Zellen zurückgeführt werden. Die obere Normgrenze liegt bei den meisten Untersuchern um 100-150 ng/ml und macht damit etwa das 30-50fache des CEA-Serumspiegels aus. Höhere Konzentrationen wurden für Neugeborene beschrieben (40).

Da sowohl bei Patienten mit benignen Erkrankungen als auch bei Patienten mit tumorösen Prozessen erhöhte NCA-Spiegel gemessen wurden und keine signifikante Korrelation mit dem Krankheitsverlauf festzustellen war, wurde der Nutzen von NCA als Tumormarker verneint (36). Als Marker bei der chronisch myeloischen Leukämie CML kommt dem NCA jedoch eine Bedeutung zu (22). Im Serum von Patienten mit CML zeigen sich höhere Spiegel als bei nicht leukämischen Personen oder Patienten mit AML (92). Die NCA-Spiegel korrelierten mit der Anzahl reifender Myelozyten im Blut und mit dem klinischen Verlauf.

Kürzlich beschrieben BUCHEGGER et al.(4) neben dem NCA-1, das sie als NCA-55 (Mol.Gew. 55000) bezeichneten, noch ein weiteres mit NCA-1 sehr eng verwandtes Antigen, das sie NCA-95 (Mol.Gew.

95000) benannten und das in Perchlorsäure-Extrakten der normalen Lunge und auf der Oberfläche normaler Granulozyten nachweisbar war. Nach letzten Untersuchungen soll das NCA-95 ausschließlich in Granulozyten vorkommen und somit für die Reaktion mancher sogenannter spezifischer monoklonaler Anti-CEA-Antikörper mit Granulozyten verantwortlich sein.

Wie bereits vorhin erwähnt, ist das von KESSLER et al.(33) beschriebene TEX dem NCA₁ sehr ähnlich und immunologisch identisch. Dieses Antigen wurde aus Perchlorsäure-Extrakten von Lebermetastasen bei primärem Colon-Karzinom mittels Gel-filtration isoliert.

2.2.2 NCA₂

Das nicht spezifisch kreuzreagierende Antigen-2 wurde erstmals 1973 von BURTIN und Mitarbeitern (6) aus Mekoniumextrakt isoliert. Wie dieselbe Arbeitsgruppe in weiteren Untersuchungen ermittelte, wandert NCA₂ in der Immunelektrophorese ebenso wie CEA und NCA mit den beta-Globulinen und besitzt in etwa ein Molekulargewicht von 160000 D (5,36). Der Kohlehydratanteil beträgt ca. 50%, wobei in der Zusammensetzung der Aminosäuren wie der Zucker nur geringfügige Differenzen mit CEA festzustellen sind. Mit Hilfe immunfluoreszenzoptischer Methoden konnten BURTIN et al. (8) das Glykoprotein im Zytoplasma von gastrointestinalen Normal- und Tumorgewebe sowie als Bestandteil der Magen- und Darmmukosa nachweisen, was sein Vorkommen im Mekonium und Stuhl erklärt.

Kürzlich wurden noch zwei weitere Antigene isoliert, die dem NCA₂ sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch damit sind. Es handelt sich um NFA₂ sowie um das Mekonium-Antigen.

NFA₂ wurde von KUROKI et al.(43) aus Stuhl durch Perchlorsäure-Extraktion, Affinitätschromatographie und Gelfiltration extrahiert. Wie spätere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe (50) zeigten, kommt NFA₂ auch im Mekonium vor, hat ein ähn-

liches Molekulargewicht wie NCA_2 und auch beta-Mobilität in der Elektrophorese.

Das Mekonium-Antigen wurde von PRIMUS und Mitarbeitern (60) aus Mekonium mittels 40%igem Äthanol extrahiert. Es ist sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch mit NCA_2 , hat ein Molekulargewicht von 185000 und eine alpha-Mobilität.

2.2.3 BGP

2.2.3.1 Vorkommen und Lokalisation

Das biliäre Glykoprotein BGP I wurde erstmals 1976 von SVENBERG (74) beschrieben. Mittels Immunelektrophorese und OUCHTERLONY-Doppeldiffusion (57) konnte er zeigen, daß es sich um ein in der Galleflüssigkeit vorkommendes Antigen handelt, das mit CEA und NCA kreuzreagiert. Gleichzeitig konnte SVENBERG aus "weißer Galle" zwei weitere Glykoproteine isolieren, die er BGP II und BGP III nannte. Bei späteren Untersuchungen wurde jedoch der Verdacht bestätigt, daß es sich bei BGP II um NCA und bei BGP III um CEA handelt.

Nach Herstellung eines spezifischen Anti-BGP I-Serums konnten SVENBERG und Mitarbeiter (75) 1978 mit Hilfe von immunfluoreszenzoptischen Verfahren erste Angaben über Herkunft und Verteilung des biliären Glykoproteins BGP I machen (76). Demnach war das Antigen in den Canaliculi, größeren Gallengängen und auf der Oberfläche der Gallenblasenmukosa lokalisiert. Da sich keinerlei Endothelzellen des Gallengangsystems darstellten, ergab sich kein Hinweis für einen möglichen Ausscheidungsmechanismus des biliären Glykoproteins. Auch in anderen Ge-

weben des Gastrointestinaltraktes ergab sich kein Anhalt für das Vorhandensein von BGP.

Nach Entwicklung eines BGP I-Radioimmunoassay untersuchten SVENBERG et al. (77) zunächst die Serum-BGP-Spiegel bei Normalpersonen, bei Patienten mit Erkrankungen der Leber oder des Gallentraktes (Hepatitis A+B, Verschlußikterus, primär biliäre Zirrhose) sowie bei Patienten mit entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen ohne Leberbeteiligung (Pneumonie, Meningitis, Pvelonephritis, Toxoplasmose, Mumps, Thyreoiditis etc.). Der Normalwert lag bei 0,5 - 1 mg/l; alle Patienten mit Erkrankungen der Leber oder des Galletraktes wiesen zum Teil stark erhöhte BGP-Konzentrationen auf, wohingegen bei den Patienten mit Krankheitsbildern ohne Leberbeteiligung normale oder nur sehr geringfügig erhöhte BGP-Spiegel gemessen wurden. Nachdem bei den meisten Patienten mit hepatobiliären Krankheitsbildern eine deutliche Cholestase bestand, untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe (78) die Korrelation zwischen BGP-Spiegel und verschiedenen Cholestaseparametern (γ -Gt, aP, SGOT, SGPT, Bilirubin). Sie fand eine deutliche Korrelation zwischen BGP und γ -GT, und im Fall der primär biliären Zirrhose auch zwischen BGP und der alkalischen Phosphatase.

Diesen Ergebnissen zufolge erklärten sich SVENBERG und Mitarbeiter erhöhte BGP-Serumspiegel eher als Ergebnis einer Gallenwegsobstruktion als eines Leberzellschadens.

2.2.3.2 Physikochemische Eigenschaften

BGP ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 79000 und 94000 Daltons (75) und besitzt die immunoelektrophoretische Mobilität eines alpha 1-Globulins (74). Nach SVENBERG (75) beträgt der Kohlehydratanteil 40%, bestehend vor

allem aus Fucose, Mannose, Galactose, Sialinsäure und N-Acetyl-Galactosamin. Mit Ausnahme von Methionin waren alle üblichen Aminosäuren nachweisbar. Die Bindung der homogenen Polypeptidkette an die Polysaccharidkette erfolgt wahrscheinlich über Asparagin-N-Acetyl-Glucosamin (75).

2.2.3.3 Nachweismethoden

Da die BGP-Konzentrationen auch bei pathologischem Vorkommen nur im ng/ml-Bereich lagen, war die einzig mögliche Nachweismethode der hochempfindliche Radioimmunoassay.

Einzelheiten über den RIA, die Reinigungsmethoden und die klinische Bedeutung des BGP I werden im Abschnitt "Diskussion " besprochen.

3. METHODIK

3.1 Analytische Verfahren

3.1.1 Gesamt-Eiweiß

Die Gesamteiweißbestimmung wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay nach BRADFORD (2) als Mikroverfahren (1,0 ml Bio-Rad Reagenz, 0,1 ml Probe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und im Spectralphotometer (DB)¹ bei 595 nm abgelesen. Als Standard diente bovines Serum-Albumin in vier verschiedenen Konzentrationen.

3.1.2 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde nach der Methode von GRABAR und WILLIAMS (27) in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER (72) auf Objektträgern in der Universalelektrophoresekammer² durchgeführt. Die Spannung betrug 200 V bei einer Stromstärke von 25 mA, die Laufzeit 60 min. Als Gel wurde 2%-iger Reinagar in 1:2 verdünntem Veronal-Na-Na-Acetatpuffer (pH 8,6), zur Färbung Azokarmin in einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10) verwendet.

3.1.3 Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (57)

Prinzip:

Es handelt sich um eine immunologische Nachweismethode, bei der man Proteine (Antigene bzw. Antikörper) in einer Gelmatrix gegen Referenzsubstanzen unterschiedlicher Art diffundieren läßt.

1 Fa. BECKMAN INSTRUMENTS, München

2 Fa. CAMAG, Muttenz (Schweiz)

Dadurch werden Antigen-Antikörperreaktionen als fixe Präzipitationslinien im Gel sichtbar. Man benutzt diese Methode besonders zur Prüfung der Reinheit von Antigen- und Antikörper-Präparationen.

Durchführung:

Man beschichtet Objektträger mit erhitztem 2% igem Difco-Agar¹. Nach Abkühlung werden mit einer speziellen Stanze Rosetten (6 konzentrisch angeordnete Reservoirs mit einem Durchmesser von 2mm um ein zentrales Reservoir) ausgestanzt und mittels einer 20 ul-Eppendorf-Pipette² mit dem gewünschten Untersuchungsmaterial beschickt. Nach einer Diffusionszeit von 24-48 h werden die Plättchen in physiologischer Kochsalzlösung über 24 h gewässert, getrocknet (24h), dann mit Azokarmin-Lösung gefärbt und in einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10) entfärbt.

3.1.4 Radioimmunoassay

3.1.4.1 Prinzip

Bei dem Radioimmunoassay handelt es sich um eine hochempfindliche analytische Methode zur Bestimmung von Antigenkonzentrationen.

Tabelle 2 gibt ein Pipettierschema für den BGP-Radioimmunoassay wieder. Im Testansatz mischt man definierte Mengen der Proben- oder Standardlösung mit dem spezifischen Antikörper und gibt nach einer "kalten" Vorinkubation den Tracer (markiertes Antigen) hinzu. Zwischen dem unmarkierten (Probe) und dem markierten Antigen findet bis zum Einstellen eines dynamischen Gleichgewichts eine Konkurrenzreaktion um die freien Liganden des Antikörpers statt.

1 Fa. DIFCO Lab., Detroit (USA)

2 Fa. EPPENDORF, Hamburg

B G P - R A D I O I M M U N O A S S A Y

SUBSTANZ	TOTAL	N	O	STANDARD	PROBE
-----	-----	-	-	-----	-----
PUFFER+PS 10%	-	200	200	200	-
PUFFER	-	200	100	-	200
STANDARD	-	-	-	100	-
PROBE	-	-	-	-	100
1. AK	-	-	100	100	100

1. INKUBATION, 37⁰C, 5 H

BGP I ^x	100	100	100	100	100
--------------------	-----	-----	-----	-----	-----

2. INKUBATION, R.T., 15-24 H, dann

ENTWEDER

2. AK	-	100	100	100	100
-------	---	-----	-----	-----	-----

3. INKUBATION, R.T., 16-24 H

ZENTRIFUGATION, R.T., 1200 G, 30 MIN

ODER

PEG 6000 (15%)	-	1000	1000	1000	1000
----------------	---	------	------	------	------

3. INKUBATION, R.T., 15 MIN.

ZENTRIFUGATION, R.T., 1000 G, 30 MIN.

TABELLE 2: BGP-Radioimmunoassay - Pipettierschema

Die dabei entstehenden, meist löslichen Immunkomplexe werden mit Hilfe eines 2. Antikörpers, der gegen Immunglobuline der Spezies des 1. Antikörper-Bildners gerichtet ist, oder durch andere Methoden (Ammoniumsulfat, Polyäthylenglykol, Zirconylphosphat) gefällt, durch anschließendes Zentrifugieren und Dekantieren vom nicht gebundenen Anteil getrennt und im Gammazähler gemessen. In Abhängigkeit von der Konzentration des unmarkierten Antigens der Proben nimmt im umgekehrten Verhältnis der gebundene Anteil des Tracers und somit die gemessene Radioaktivität ab. Aus den Meßwerten mehrerer Standardlösungen mit ansteigender Antigenkonzentration wird eine Eichkurve erstellt, an der die entsprechenden Analysenproben abgelesen werden können.

3.1.4.2 Durchführung

3.1.4.2.1 Markierung

Die Markierung von gereinigtem BGP wurde mit radioaktivem ^{125}J nach der Methode von HUNTER (32) vorgenommen.

Prinzip:

Natriumjodid $^{125}\text{J}^-$ wird durch das Oxidationsmittel Chloramin T in das reaktive ^{125}J übergeführt, welches mit hoher Ausbeute in die Tyrosinreste des zu markierenden Proteins eingebaut wird. Durch Zusatz eines Reduktionsmittels wie Na-Di-Sulfit kann diese Reaktion sofort unterbrochen werden. Die höchste Markierungsausbeute für die Chloramin T-Methode erfolgt bei einem pH von 7,5. Um das zu markierende Protein nicht zu schädigen, sollten möglichst kleine Mengen an Chloramin T, Na-Di-Sulfit sowie Radioaktivität gewählt werden.

Vorgehen:

Vor der Markierung wurde die Na-¹²⁵J-Lösung¹ (Aktivität 1 mCi) im Versandgefäß mit 70 µl 0,5 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) verdünnt. Anschließend wurden folgende Substanzen nacheinander mit Eppendorf-Pipetten in ein 1 ml-Kunststoffreagenz² gegeben:

- 20 µl BGP-Lösung, enthaltend 10 µg BGP (gelöst in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,5)
- 10 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,5)
- 20 µl Na-¹²⁵J-Lösung mit 0,3 mCi
- 20 µl Chloramin T-Lösung (50 µg ChloraminT in 0,05M Phosphatpuffer, pH 7,5 ; frisch angesetzt)

Nach Mischen und Inkubation während 35 sec Zugabe von:

- 25 µl Na-Di-Sulfitlösung (12 µg Na-Di-Sulfit in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5)

Nach sofortigem Mischen Zugabe von:

- 200 µl 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 2% Serumalbumin vom Rind (BSA)

3.1.4.2.2 Reinigung des markierten Proteins

Zur Abtrennung des markierten Proteins von freiem, nicht gebundenen ¹²⁵J wurde das gesamte Reaktionsgemisch auf einer Sephadex G 50 fine-Säule (1x15 cm) chromatographiert. Um eine Adsorption des zu reinigenden Proteins zu vermeiden, war die Säule mit 0,07 M Veronalpuffer (pH 8,6; + 2,5% BSA)vorbehandelt worden.

1 Fa. HÖCHST AG, Frankfurt

2 Fa. EPPENDORF, Hamburg

Eluiert wurde mit 0,07 M Veronalpuffer (pH 8,6). Mittels eines Fraktionskollektors¹ wurden die 1 ml-Fraktionen in kleinen Eppendorfgefäßen gesammelt, in die 0,2 ml Veronalpuffer mit 2,5% BSA vorgegeben waren. Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen sowie der benutzten Pipettenspitzen und des leeren Reaktionsgefäßes wurden in einem mäßig empfindlichen Gammazähler² (LB 2040) gemessen.

Die Proteinpeaks mit der höchsten Aktivität wurden auf einer Sephadex G 200-Säule rechromatographiert, mit o.g. Elutionspuffer eluiert, in 1 ml-Fraktionen gesammelt und im Gammazähler gemessen. Die gemessene Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in ein Diagramm eingezeichnet, an Hand dessen mehrere geeignete Fraktionen ausgewählt, gepoolt und mit RIA-Verdünnungspuffer (0,01 M Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl + 1% BSA + 0,4% EDTA-Titriplex, pH 8,2) so verdünnt wurden, daß in 100 µl mit einem empfindlichen Gammazähler³ etwa 20000 counts/min gemessen wurden.

Die so hergestellte BGP-Tracer-lösung wurde in 10 ml- Röhrchen abgefüllt und bei - 40° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.1.4.2.3 Antikörpervedünnungskurve (Testung des 1. AK)

Prinzip:

Zur Ermittlung der für den Radioimmunoassay geeigneten Konzentration des 1. Antikörpers (entsprechend einer Bindung von 30 - 50% der zugeführten Gesamtaktivität) wird von dem gereinigten Antiserum bzw. der IgG-Fraktion eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt, der konstante Mengen an markiertem Antigen zu-

1 Fa. LKB, Bromma (Schweden)

2 Fa. BERTHOLD, Wildbad

3 Fa. LKB, Gammacounter 1260 Multigamma II

gegeben werden. Nach 24-stündiger Inkubation werden die meist löslichen Immunkomplexe durch Hinzufügen des 2. Antikörpers (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege) gefällt, abzentrifugiert und das Präzipitat nach Dekantieren des Überstandes im Gammazähler gemessen.

Der N-Wert gibt die unspezifische Bindung an, d.h. den Anteil an Aktivität, der ohne Zugabe von spezifischem Antikörper allein durch den Trennschritt (2. Antikörper) oder aber durch Adsorption des Tracers an die Gefäßwand gebunden wird.

Durchführung:

Folgende Substanzen wurden in je 2 Polystyrolröhrchen (12x55 mm)¹ zusammengegeben:

- a) Total: 100 ul markiertes Antigen BGP^x
- b) N-Wert: 100 ul markiertes Antigen BGP^x
+300 ul RIA-Puffer
- c) Probe: 100 ul markiertes Antigen BGP^x
+200 ul RIA-Puffer
+100 ul 1. Antikörper(Anti-BGP-Serum v.Kaninchen)
1:1000 bis 1:1024000

Nach sorgfältigem Mischen mit Hilfe eines VORTEX-Genie-Schüttlers² und einer 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden den Röhrchen b) und c) zugegeben:

+100 ul 2. Antikörper(Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Serum von der Ziege, 1:15 mit RIA-Puffer verdünnt)

1 Fa. BOLL, München

2 Fa. BENDER & HOBEIN, München

Nach erneuter Inkubation (24 h, R.T.) wurden die Röhrchen b) und c) bei 3000 UpM (1000 g) zentrifugiert, durch Dekantieren der Überstand vom Präzipitat entfernt, zum Abtropfen umgekehrt auf einen saugfähigen Karton gestellt und die noch verbliebene Flüssigkeit ohne Berühren des Bodenstandes durch sorgfältiges Auswischen mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde die Radioaktivität der Röhrchen im Gammazähler¹ über 60 sec gemessen.

3.1.4.2.4 Standard-Inhibitionskurve

Prinzip:

Um unbekannte Patientenproben bestimmen zu können, werden im Test bekannte Konzentrationen von unmarkiertem Antigen (Standards) eingesetzt und bestimmt. Dadurch erhält man eine konzentrationsabhängige Verdrängung des markierten Antigens (Tracer) von dem Antigen-Antikörperkomplex. Da die Konzentration an Antikörper und Tracer konstant ist, wird durch Erhöhung der Konzentration an unmarkiertem Antigen (Standard) erreicht, daß weniger Tracer, d.h. Aktivität vom Antikörper, gebunden wird.

Die Standard Eichgerade wird durch die Standard-Inhibitionskurve dargestellt, an der die entsprechenden Analysenproben später durch Interpolation abgelesen werden können. Die Standard-Inhibitionskurve wird aus der relativen Verdrängung des Tracers vom Antikörper durch die in der Standard-Verdünnungsreihe sinkenden Konzentrationen des gewünschten Standards in Bezug auf die maximale Bindung von markiertem Antigen und Antikörper ohne Standard (=100%) ermittelt. Die Bindungskapazität (in Prozenten der Gesamtaktivität) liegt bei dem Doppel-Antikörper-RIA-Verfahren meist zwischen 20 und 35%.

Der Testansatz wird nach folgendem Schema angesetzt:
(jeweils Doppelbestimmungen)

1 Fa. LKB, Gammacounter 1260 Multigamma II

- a) Total: 100 ul markiertes Antigen BGP^X
- b) N-Wert: 100 ul markiertes Antigen BGP^X
+ 400 ul RIA-Puffer
- c) Standard: 100 ul markiertes Antigen BGP^X + 1/200 Kan.Serum
+ 200 ul RIA-Puffer + 10% Pferdeserum
+ 100 ul Standard-Lösung in Verdünnungspuffer
entsprechend einer geometrischen Reihe von 160-
0,62 E/ml, bzw. 0 E/ml als Leerwert ohne Standard
+ 100 ul 1. Antikörper der ermittelten Verdünnung
- Nach Mischen auf einem VORTEX-Mixer¹ und Inkubation (24h, R.T.)
wird den Röhrchen b) und c) zugegeben:

E N T W E D E R

+ 100 ul 2. Antikörper der Verdünnung 1:15

und 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur

O D E R

+ 1000 ul PEG 15% (Polyäthylenglykol gelöst in Aqua
destillata)

und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

3.1.4.2.5 BGP-Radioimmunoassay

Der BGP-Test wurde als direkter Test mit unbehandelten Patientenserum oder sonstigen Proben durchgeführt.

Bei Ansatz eines Assays wurde nach folgendem Schema pipettiert
(immer Doppelbestimmungen), siehe Tabelle 2:

1 Fa. BENDER & HOBEIN, München

- a) Total: -
- b) N-Wert: 200 ul RIA-Puffer + 10% Pferdeserum
+ 200 ul RIA-Puffer
- c) Standard: 200 ul RIA-Puffer + 10% Pferdeserum
+ 100 ul Standardlösung (geometrische Verdünnungs-
reihe von 160 - 0,62 E/ml)
+ 100 ul 1. Antikörper in der ermittelten Verdünnung
- Leerwert: 200 ul RIA-Puffer + 10% Pferdeserum
+ 100 ul RIA-Puffer
+ 100 ul 1. Antikörper

Analysen-

- probe: 200 ul RIA-Puffer
+ 100 ul Probe
+ 100 ul 1. Antikörper

Nach einer Vorinkubation (6 h, bei 37⁰ C) erfolgt Zusatz von:

- a) Total: 100 ul markiertes Antigen (Tracer)
- b) N-Wert: 100 ul "
- c) Standard: 100 ul Tracer BGP^x

Leerwert: "

Probe: "

Nach Mischen Und Inkubation (16 - 24 h, R.T.) werden den
Röhrchen b) und c) zugegeben:

E N T W E D E R

100 ul 2.Antikörper(1:15 verdünnt in RIA-Puffer)

mit anschließender 24-stündiger Inkubation bei R.T.

O D E R

1000 ul PEG 15% (Polyäthylenglykol gelöst in Aqua
destillata)

mit anschließender 30-minütiger Inkubation bei R.T..

Anschließend wurde wie bei der Antikörperverdünnungskurve
verfahren.

Um die Reproduzierbarkeit des BGP-Radioimmunoassay zu
gewährleisten, wurde bei jedem Test die Bestimmung von 2
Kontrollproben in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen
durchgeführt.

3.2 Präparative Verfahren

3.2.1 Galle-Extraktion

Die Galleproben wurden in erster Linie aus T-Drainagen (Endoprothesen, die zur postoperativen Drainierung der Gallenwege eingesetzt werden) entnommen, aber auch aus vorübergehend angelegten PTC-Kathetern bei Patienten mit extrahepatischem Verschlubleiden.

Das so gewonnene Material wurde mit 200 mg Natriumazid pro Liter Galle versetzt, in 2-Liter-Gefäße abgefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C in einer Labortiefkühltruhe¹ aufbewahrt. Für eine Extraktion wurden etwa 3 - 4 Liter Galle über Nacht bei Zimmertemperatur aufgetaut, anschließend nach Zugabe des gleichen Volumens an 1,2 M Perchlorsäure mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt und 30 min inkubiert. In 200 ml-Gläser abgefüllt, wurde die Suspension 20 min bei 1000 g zentrifugiert, das Präzipitat verworfen und der Überstand gesammelt. Nach Einfüllen des sauren Galleextrakts in große KALLE-Dialyseschläuche² schloß sich eine 48-stündige Dialyse gegen Leitungswasser an. Mittels eines AMICON-Systems³ wurde das ca. 6-8 Liter messende Dialysat auf etwa 100 ml eingeeengt und durch Nachspülen mit destilliertem Wasser entsalzt. Waren die Extrakte für eine baldige Weiterverarbeitung vorgesehen und somit keine Lyophilisation nötig, wurde mit Na-Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,13 M) nachgespült und dadurch die Flüssigkeit bereits vor dem Einfrieren auf die Verhältnisse der sich anschließenden Säule eingestellt. In beiden Fällen wurde das Endvolumen aus der Zelle entnommen, für eine Stunde bei 10000 g zentrifugiert, anschließend durch einen Filtersatz (Druckfiltrationsgerät SM 16223⁴) mit Glasfaservorfilter und Filtern der Stärke 3,0; 1,2; 0,6; und 0,2 gepreßt und dann lyophilisiert bzw. in Portionen eingefroren.

1 Fa. KÖTTERMANN, Hämigsen, Hannover

2 Fa. KALLE, Wiesbaden-Biebrich

3 Fa. AMICON, Oosterhout, Holland

4 Fa. SARTORIUS, Membrabfilter-ges.; Göttingen

3.2.2 Zentrifugation

Nach Fällung mit Perchlorsäure wurde das saure Gallgemisch in einer CHRIST-Laborzentrifuge Typ UJ 3S¹ bei 1000 g 20 min zentrifugiert.

Das Extraktionsprodukt vor der Lyophilisation sowie absorbierte Kaninchen Anti-BGP-Seren wurden für eine Stunde bei 10000 g (15000 UpM) mit Hilfe einer CHRIST-Laborzentrifuge Typ UJ 15000 zentrifugiert.

Die für den BGP-Radioimmunoassay bestimmten Seren wurden aus Nativblut in einer HETTICH ROTANTA/K² gewonnen (10m; 3000UpM=1000g).

Für die Zentrifugation der RIA-Teströhrchen wurde nach Zugabe des 2. Antikörpers bzw. PEG und nach entsprechender Inkubation eine HETTICH-SILENTA/K Kühlzentrifuge verwendet (30 min; 1000g).

3.2.3 Dialyse

Der bei der Perchlorsäure-Extraktion gewonnene stark saure Galleextrakt wurde in Dialysierschläuche vom Kaliber 38³ in 1000 ml-Portionen abgefüllt. Die Schläuche wurden an den Enden mit Doppelknoten verschlossen und in 10-Liter-Durchfluß-Eimern 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Vor Auftrennung von Kaninchenserum auf Protein A-Sepharose 4B-Säulen zur IgG-Gewinnung mußten sie gegen den Startpuffer (0,02 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,3, + 0,15 M NaCl + 0,02% NaN₃) mit Hilfe von Kollodiumhülsen äquilibriert werden.

Wie bereits erwähnt, wurde der Galleextrakt vor der Ultrafiltration bei geplanter Lyophilisation durch Dialyse mit steri-

1 Fa. CHRIST, Osterode, Harz

2 Fa. HETTICH, Tuttlingen

3 Fa. KALLE, Wiesbaden-Biebrich

lem destillierten Wasser entsalzt, bzw. vor dem portionsweisen Einfrieren durch Spülen mit Na-Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,13 M) auf die sich anschließende Säulenchromatographie eingestellt. Dazu wurden die "Spülflüssigkeiten" dem auf etwa 200 ml eingengten Extrakt zugegeben und ebenfalls durch die Filtrationsmembran gepreßt.

3.2.4 Einengung

Im Anschluß an die Dialyse wurde der Galleextrakt (ca. 4 Liter) in einem AMICON-Ultrafiltrationssystem¹, bestehend aus einer Preßluftflasche, einem 4-Liter-Vorratsbehälter, einer Einengungszelle (UF 400) mit eingebautem Rührmagneten sowie einem automatischen Endpunktüberwachungsgerät (EC 20), eingengt. Bei einem Filtrationsdruck von 5 kg/cm^2 wurde der Extrakt in der Einengungszelle (UF 400) durch eine semipermeable Diaflo-Membran vom Typ PM 10 (Ausschlußgrenze bei MG 12500) gefiltert und nach Spülen mit sterilem destillierten Wasser bzw. Na-Phosphatpuffer auf ca. 100 ml Endvolumen eingengt.

Größere Volumina von Säulenchromatographie-Fractionen wurden ebenfalls mit Hilfe des Amiconsystems, jedoch in einer kleineren Zelle (UF 200), konzentriert.

Für kleinere eiweißhaltige Flüssigkeitsmengen wurden zur Einengung Kollodiumhülsen² (SM 13200) aus Zellulose-Nitrat (15 x 75 mm) benutzt, die mittels einer Haltevorrichtung² (SM 16311) an das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe (bis 500 mmHg) angeschlossen waren. Für eine erneute Chromatographie wurden die Fractionen in den Kollodiumhülsen gegen den Elutionspuffer der nächsten Säule eingengt und äquilibriert.

1 Fa. AMICON, Oosterhout, Holland

2 Fa. SARTORIUS - Membranfilter-ges., Göttingen

3.2.5 Lyophilisation bzw. Einfrieren

Der konzentrierte und entsalzte Galleextrakt (ca. 100 ml) wurde nach der Bakterienfiltration mittels eines Lyophilisiergerätes¹ gefriergetrocknet. War der Extrakt für eine baldige Weiterverarbeitung bestimmt, so wurde der gegen DEAE-Puffer-äquilibrierte Extrakt in 20 ml-Portionen abgefüllt und vorübergehend bei - 20° C eingefroren.

3.2.6 Säulenchromatographie

3.2.6.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Mittels der Ionenaustausch-Chromatographie können Proteingemische je nach ihrem unterschiedlichen Ladungszustand und dem verwendeten Puffersystem chromatographisch aufgetrennt werden.

Zur Isolierung von BGP aus dem Perchlorsäure-Extrakt wurde als erster Schritt mit einer DEAE-Sephacel-Säule gearbeitet. Es handelt sich dabei um ein Anionenaustauscherharz in gekörnter Form, gut geeignet zur Auftrennung von Proteinen mittleren Molekulargewichts. Die bereits gequollene Zellulose² wurde lediglich gegen den Startpuffer (0,13 M Phosphatpuffer, pH 7,5) äquilibriert, entgast und auf eine 2,6 x 40 cm große Säule gepackt. Darauf wurden 20 - 30 ml äquilibrierten Perchlorsäureextrakts aufgetragen und mittels einer Schlauchpumpe³ mit dem Startpuffer eluiert. Nach Erscheinen des Hauptpeaks wurde mit Grenzpuffer (0,5 M Na-Phosphatpuffer; pH 4,5) weiter eluiert, so daß nach und nach alle Proteine eluiert wurden. Anschließend wurde die DEAE-Säule wieder gegen den Startpuffer äquilibriert.

1 Fa. CHRIST, Osterode, Harz

2 Fa. SERVA, Heidelberg

3 Fa. LKB, Varrio-Perpex-Schlauchpumpe

3.2.6.2 Gelfiltration

Durch Gelfiltration ist es möglich, die Komponenten von Proteingemischen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Molekularsieb-Chromatographie). Sephadex G¹, ein kugelförmiges polymerisiertes Dextrangel, wurde für die Reinigung des ¹²⁵J-markierten biliären Glykoproteins BGP gewählt. Je nach Porengröße und Vernetzungsgrad der Gele stehen verschiedene G-Typen mit unterschiedlichen Fraktionsbereichen zur Verfügung.

SEPHADEX G 50 FINE, das vorwiegend im Molekulargewichtsbereich zwischen 1500 und 30000 trennt, wurde zur Trennung von BGP und nicht gebundenem freiem Jod in dem bei der Markierung entstehendem Reaktionsgemisch eingesetzt.

Die Säule war 1 x 15 cm groß, der Elutionspuffer 0,07 M Veronalpuffer, pH 8,6.

Zur Gewinnung einer homogenen Fraktion von ¹²⁵J-BGP wurde der Proteinpeak der Sephadex G 50-Säule anschließend auf einer Sephadex G 100- Säule rechromatographiert, einem Dextrangel mit Fraktionierungsbereich zwischen MG 5000 und 600000. Die Säule war 1,5 x 35 cm groß, eluiert wurde wieder mit Veronalpuffer (0,07 M; pH 8,6).

3.2.6.3 Affinitätschromatographie

3.2.6.3.1 Kohlenhydratspezifische Bindung mit CON A-SEPHAROSE

Concanavalin A ist ein pflanzliches Metalloprotein, das spezifisch mit Kohlehydraten und Glykoproteinen reagiert. Um diese Eigenschaft auszunützen, wird Concanavalin A mittels der Cyanogen-Bromid-Methode kovalent an Sepharose 4B gebunden und dient somit als Ligand für gruppenspezifische Affinitätschromatographie von Kohlehydraten.

Bei der Isolierung von BGP aus Galleflüssigkeit wurde diese Methode anschließend an die Ionenaustauscher-Chromatographie mit DEAE-Sephacel eingesetzt. Das gegen den Startpuffer (0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 6,3, + 1M NaCl, + 1mM MnCl_2 , + 1mM MgCl_2 , + 1mM CaCl_2 , + 0,02% NaN_3) äquilibrierte Con A-Sepharose - Gel¹ wurde auf eine 1 x 15 cm große Säule gepackt und anschließend nochmals mit reichlich Puffer nachgespült. Das Gel wurde mit den eingengten Fraktionen I und II der DEAE - Sephacel - Säule beschickt, nicht gebundene Substanzen mit dem Startpuffer wieder eluiert, BGP an Concanavalin A gebunden. Nach Elution der nicht gebundenen Proteine wurden mit Desorptionspuffer (Startpuffer + 5%iger 1-O-M-a-D-glucopyranosid) die gebundenen Proteine eluiert.

3.2.6.3.2 IgG - Bindung mit Protein A - Sepharose CL 4B

Das aus der Zellwand von Staphylokokkus aureus isolierte Protein A wird ebenso wie Concanavalin A mit der Cyanogen - Bromid - Methode durch kovalente Bindung an eine Sepharose 4B - Matrix fixiert.

Für die Isolierung der meisten IgG - Antikörper ist die Affinitätschromatographie mit Protein A - Sepharose die Methode der Wahl.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Antiserum vom Kaninchen auf eine Protein A - Sepharose CL-4B - Säule gegeben, um spezifisches Anti-BGP-IgG zu erhalten.

Nachdem das Gel¹ 15 Minuten gequollen und mehrmals mit dem Startpuffer (0,02 M Na-Phosphatpuffer pH 7,3 + 0,15 M NaCl + 0,02% NaN_3) gewaschen worden war, wurde es auf eine 1 x 15 cm große Säule gepackt. Im ersten Elutionspeak erschienen wieder die nicht gebundenen Proteine des Antiserums, erst nach Anschließen des Desorptionspuffers (Startpuffer + 0,58% Eisessig) wurde die gebundene IgG - Fraktion eluiert.

1 Fa. PHARMACIA, Uppsala

3.2.6.3.3 Immunadsorptions - Chromatographie

Diese Art Säulenchromatographie dient dazu, spezifische Proteinmoleküle durch Kopplung an einen Liganden vorübergehend auf einer Matrix zu fixieren. Als Liganden können Antigen- oder Antikörperpräparationen verwandt werden, je nach Art der zu isolierenden Substanz. Über die Säule gegebene Proteine gehen nur dann eine Bindung ein, wenn es sich um homologe Antigene bzw. Antikörper handelt. Nach Elution aller ungebundenen Substanzen kann durch einen Pufferwechsel in saures oder alkalisches Milieu bzw. chaotrope Ionen das gewünschte Protein wieder von der Ag - Ak - Bindung mit der CNBr-aktivierten Sepharose gelöst werden. Die Herstellung der Immunadsorptions - Säulen erfolgte nach folgenden Prinzip:

Pro Säule wurden 5-10 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B als Pulver abgewogen, 15 min in 1-2 Liter 0,001 M HCL gewaschen und bis auf 100 ml auf einer Nutsche abgesaugt. Der Antikörper bzw. das Antigen wurde in 20 ml 0,1 M NaHCO_3 mit 0,5 M NaCl pH 8,3 gelöst und mit dem hergestellten Gel gemischt. Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C auf einem Horizontal-Rotator überkopf gedreht. Der nicht gebundene Anteil des Immunglobulins wurde mit Na-Bikarbonat-Puffer über einer Fritte ausgewaschen. Die restlichen reaktiven CNBr-Gruppen wurden mit 1 M Glycin (pH 8,0) über 2 Stunden blockiert, die nicht kovalent gebundenen Antikörper in 3 Waschzyklen mit Acetatpuffer (0,1 M in 1 M NaCl; pH 4,0) und Boratpuffer (0,1 M in 1 M NaCl; pH 8,0) von dem Gel entfernt. Anschließend konnte das Gel auf eine Säule gepackt werden. Zum Vorlaufen und zum Eluieren unspezifischer Eiweißkörper der aufgetragenen Fraktionen wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (0,02 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,3, + 0,9% NaCl, + 0,02% NaN_3) verwandt. Die Extinktion der eluierten Proteine wurde mit einem empfindlichen Durchfluß-Spectralphotometer¹ gemessen und mit

1 Fa. C. ZEISS, Oberkochen

einem linearen Potentiometerschreiber¹ aufgezeichnet. Nach Elution ungebundener Proteinbestandteile der Probe wurde noch für 1 - 2 Stunden mit dem Anfangspuffer nachgewaschen, um dann durch Anschließen des Endpuffers (0,02 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,3, + 0,9% NaCl, + 2 M KSCN) das gebundene Immunglobulin zu eluieren.

Antigen - Adsorptions - Säulen

Da zu Beginn der Extraktion von BGP aus Galleflüssigkeit noch kein spezifischer Antikörper für eine Immunadsorptionssäule vorhanden war, wurde die CON A-gebundene Proteinlösung auf eine Anti-"NCA"-Säule (die mit NCA kreuzreagierende Antikörper enthielt) aufgetragen und somit der kreuzreagierende Effekt zwischen BGP und NCA ausgenutzt. Als später durch Immunisierung mit dem Antigen BGP ein spezifisches Antiserum hergestellt worden war, wurde ein Teil des gereinigten Immunglobulins für eine Anti-BGP-Säule verwandt und fortan das Antigen mit Hilfe dieser Säule isoliert.

Antikörper - Adsorptions - Säulen

Die Endreinigung des spezifischen Anti-BGP-IgG vom Kaninchen wurde mittels zweier Antikörper-Immunadsorptions-Säulen durchgeführt. Um kreuzragierende NCA - bzw. CEA - Antikörper von dem gewünschten "reinen" Anti-BGP zu entfernen, wurde mit Immunadsorptions-Säulen gearbeitet, die als Liganden die Antigene NCA (Lungen-PCA-Extrakt) und reines CEA enthielten und so die unerwünschten Antikörper binden konnten.

1 Fa. METRAWATT, Nürnberg

3.2.6.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Im Vergleich zur herkömmlichen Säulenchromatographie handelt es sich um ein Verfahren, das ein sehr hohes Auflösungsvermögen für Proteingemische besitzt. Durch entschieden kleinere Matrixpartikel wurde eine große Reaktionsoberfläche geschaffen, durch einen proteinverträglichen Überzug der Kieselerdeteilchen ein hoher Wirkungsgrad erreicht.

High Performance Anion Exchange Liquid Chromatography

Die elektrisch geladenen Proteinmoleküle der aufgetragenen Probe werden an die Kationen der DEAE-Matrix reversibel gebunden und durch anschließende Steigerung des Salzgehaltes des Puffers wieder kompetitiv aus der Bindung verdrängt.

Im Anschluß an die Anti-BGP-Säule wurde die Probe auf eine TSK 545 DEAE Ultropac-Säule¹ aufgetragen. Als Anfangspuffer wurde 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 verwandt; nach Bindung des Proteins an die Matrix wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers² bis zu einer Gesamt-Molarität von 0,5 kontinuierlich Kochsalz (Gradient 0 - 0,45) zugesetzt, um BGP zu eluieren.

Gel Permeation Chromatography

Abschließend wurde das BGP-Antigen auf einer TSK-G 4000 SWG Ultropac-Säule³ nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Elutionspuffer wurde 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 gewählt.

1 Fa. LKB, Bromma, Schweden

2 Fa. LKB, Ultrograd

3 Fa. LKB, Bromma, Schweden

3.3 Herstellung von Antiseren

3.3.1 Immunisierung

Zur Immunisierung mit Antigenmaterial wurden Immunhasen (weiße, weibliche Neuseeländer, Gewicht 4-5 kg) verwandt. Es wurden Antiseren gegen reinste, durch Affinitätschromatographie gewonnene, BGP-Präparationen hergestellt.

Die Immunisierung erfolgte in Anlehnung an ein Schema von HIJMANS et al.(29):

Erstimmunisierung:

100 - 200 µg Reinantigen wurden in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit gleichem Volumen komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt. Diese Emulsion wurde subcutan in alle 4 Pfoten des Kaninchens gespritzt.

1 Woche später wurde der gleiche Vorgang wiederholt, diesmal wurde die Lösung jedoch mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans versetzt.

I.v. Immunisierung:

3 Wochen später folgte eine 3-wöchige Serie von je 2 i.v. Immunisierungen pro Woche und mit ansteigenden Mengen einer Kalium-Aluminium-präzipitierten Antigenlösung folgender Herstellung:

- 2,5 ml gepufferte physiologische Kochsalzlösung
mit 200 - 1000 µg Antigen
- + 1,15 ml 1 N Bikarbonatlösung
- + 2,5 ml 10%ige KAL-Sulfatlösung
(tropfenweise zugegeben)

Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und dann 30 min bei 1000 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Präzipitat mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und die erhaltene Suspension in 0,5 ml-Portionen eingefroren. 3 Wochen nach der letzten s.c.-Immunisierung wurden diese Suspensionen in die Ohrvene des Kaninchens injiziert, und zwar nach folgendem Schema:

1.Woche:	0,05 ml	0,1 ml	i.v.
2.Woche:	0,1 ml	0,2 ml	i.v.
3.Woche:	0,2 ml	0,4 ml	i.v.

Nach einer weiteren Woche wurde dem Hasen eine Blutprobe entnommen und das Immunserum nach der OUCHTERLONY-Technik auf spezifische und unspezifische Antikörper untersucht. War die Konzentration des spezifischen Antikörpers ausreichend, so wurde das Kaninchen entblutet. Bei mangelnder Antikörperbildung wurde noch für einige Wochen weiterimmunisiert, bei fehlender Antikörperbildung der Versuch abgebrochen.

3.3.2 Absorption und Reinigung der Antiseren

Das erhaltene Antiserum wurde mittels der OUCHTERLONY-Technik auf Antikörper gegen Verunreinigungen, z.B. gegen Serumproteine, getestet. Im Falle des Vorhandenseins solcher Antikörper wurde eine Absorptionsreihe hergestellt, um die für eine Vollabsorption benötigte Antigenmenge zu ermitteln. Die lyophilisierten Substanzen wurden in der benötigten Menge dem Antiserum zugesetzt und mit Hilfe eines Magnetrührers in Lösung gebracht. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und über Nacht bei 4°C wurden die ausgefällten Antigen-Antikörper-Komplexe bei 10000 g abzentrifugiert, das verbliebene Antiserum erneut gegen Verunreinigungen getestet.

Wegen der Gefahr einer Kreuzreaktion von BGP mit Blutgruppensubstanzen wurde anschließend eine Absorption mit gewaschenen AB-Erythrozyten vorgenommen. Dazu wurde Antiserum dekomplementiert (30-minütiges Erhitzen auf 56°C) und mit 3-fach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenem Erythrozytenkonzentrat im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Suspension bei 700 g 10 min lang zentrifugiert, das absorbierte Antiserum vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und in ein anderes Gefäß gefüllt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis auf einem Objektträger weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Agglutination gegen Erythrozyten festzustellen war.

Da nach Vorversuchen die spezifischen Antikörper ausschließlich in der IgG-Fraktion zu finden waren, wurden diese auf einer Protein A-Säule isoliert. Um das erhaltene Anti-BGP-IgG von kreuzreagierenden CEA- und NCA-Antikörpern zu trennen, wurde als letzter Schritt die IgG-Lösung über spezifische CEA- und NCA-Antikörper-Adsorptionssäulen gegeben.

3.4 Berechnungen

3.4.1 Markierung

Für die bei der Markierung notwendigen Berechnungen wurde ein Tischrechner (HP 41C)¹ mit einem speziellen Programm benutzt. Anhand der eingegebenen Zählraten wurden zunächst die für die Markierung verwandte Gesamtaktivität (uCi), der prozentuale Aktivitätsverlust (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) sowie die Verteilung der Aktivität auf Protein- und Salzpeak der 1. Säule ermittelt. Anschließend wurde die im Proteinpeak enthaltene Aktivität in uCi sowie nach Eingabe der zur Markierung verwandten Menge BGP der davon im Proteinpeak enthaltene Anteil und die sogenannte spezifische Aktivität bestimmt. Unter Berücksichtigung der Gesamtaktivität der Säulenfraktionen und der spezifischen Aktivität des Tracers wurden Radioaktivität und Proteinmenge der für den RIA verwandten Fraktionen der proteingebundenen Aktivität der 2. Säule errechnet. Es wurde dabei vorausgesetzt, daß das gesamte Protein gleichmäßig mit ¹²⁵I markiert war.

3.4.2 Antikörperverdünnungskurve

Die für die Konstruktion einer Antikörperverdünnungskurve notwendigen Berechnungen wurden mit einem programmierbaren Taschenrechner (HP 41C)¹ durchgeführt. Zunächst wurden die Zählraten der unspezifischen Bindung (N-Wert) von den übrigen Probenwerten abgezogen. Das prozentuale Verhältnis der gebundenen Aktivität zur Gesamtaktivität (Totals) wurde für die einzelnen Verdünnungsstufen ermittelt und in einem rechtwinkligen Koordinatensystem (Ordinate: % Aktivität B-N/T-N, Abszisse: reziproke Verdünnung) aufgetragen

1 Fa. HEWLETT-PACKARD, Frankfurt

und die Kurvenpunkte mittels eines Kurvenlineals verbunden. An dieser Kurve wurde die für den Radioimmunoassay notwendige Verdünnung des 1. Antikörpers (30-40% der Gesamtbindungsaktivität = Bindungskapazität) zeichnerisch oder rechnerisch aus den Bindungsaktivitäts-Werten und zugehörigen Konzentrationsverdünnungen durch lineare Regression ermittelt.

3.4.3. Standard-Inhibitionskurve / Scatchard-Plot

Die Standard-Inhibitionskurve wurde entweder durch automatische Auswertung mittels eines computerisierten vollautomatischen Zählgerätes (LKB Wallac 1260 Multigamma II) nach der Spline-Function-Methode bzw. zur weiteren statistischen Auswertung nach dem Logit-Log-Verfahren (RODBARD et al./66) ermittelt. Dazu wurden nach einem laboreigenen HP-41-Programm die Meßdaten für die unspezifische Bindung (N-Wert), Gesamtzählraten (T) und die 0-Standards eingegeben, sodann die Zählraten für die einzelnen Standards, die als gemittelte prozentuale Bindung des Null-Standards ausgegeben wurden. Diese Werte wurden zusammen mit der zugehörigen Standard-Konzentration in ein Logit-Log-Zeichenpapier eingetragen und die Punkte mit einer Geraden nach Auge angepaßt. Nach Elimination von Ausreißern wurden die passenden Wertepaare (Bindungsaktivität / Konzentration) in den HP-41 eingegeben, wo sie nach Umwandlung in Logit bzw. Log-Konz. zur Ermittlung der Standardgeraden nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate und Berechnung der Kennwerte folgender Geraden verwandt wurden:

$$y \text{ (Logit)} = A \text{ (y-Achsenabschnitt)} - B \text{ (Steigung)} \times (\log.\text{Konz.})$$

$$\text{Logit} = 1 = \ln \frac{p}{100-p} ; \quad p = \text{Bindungsaktivität}$$

Nach dieser Standard-Geradengleichung wurden die Konzentrationswerte der Probenanalysen nach Eingabe der zugehörigen CPM-Werte (Zählraten) berechnet und nach Multiplikation mit dem Verdünnungs-

faktor in die tatsächliche Endkonzentration umgerechnet.

In ähnlicher Weise wurde mit einem laboreigenen HP-41-Programm die Scatchard-Plot-Analysenberechnung (71) vorgenommen, wobei zur Ermittlung der Affinitätskonstanten und Antigen-Konzentrationen die empirischen Mol- und B/F (bound/free)-Werte mittels linearer Regression verarbeitet wurden.

Statistische Berechnungen

Neben den Basis-Parametern von Mittelwert $\bar{x}$, Median x , Standardabweichung s , Varianz x^2 , Variationskoeffizient (VK.) aus ungruppierten und gruppierten Daten wurden auch Verteilungen sowie inverse Verteilungen und ROC-Kurven-Berechnungen mit laboreigenen HP-41-Programmen berechnet. Zu Signifikanz-Berechnungen wurden bei normalverteilten Stichproben der T-Test, bei anderen der parameterfreie U-Test, für Häufigkeitsverteilungen der Chi-Quadrat-Test oder exakte Test von Fisher bzw. der Kolmogoroff-Smirnoff-Test angewendet, für Korrelationsberechnungen der lineare Korrelationskoeffizient r bzw. der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman, wobei alle Testwerte nach entsprechenden Formeln (SACHS /70) auf laboreigenen HP-41-Programmen berechnet wurden.

4 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1 Zur Methodik verwandtes Material

4.1.1 BGP-Quelle

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von biliärem Glykoprotein wurde Galleflüssigkeit verwendet, welche aus passager angelegten Gallenwegsdrainagen gewonnen werden konnte.

Die Herkunft des verarbeiteten Materials sowie Indikation und Art der Drainage gehen aus Tabelle 3 hervor. Von jedem Patienten konnten im Mittel 2 - 6 Liter Galle gepoolt werden, insgesamt waren etwa 60 Liter für die Extraktion verfügbar. Der BGP-Gehalt der Gallen betrug durchschnittlich 2,6 mg/l. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wurden 200 mg Natriumazid pro Liter Galle (0,02%) zugesetzt. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte in 2 Liter - Gefäßen bei - 20° C.

ANZAHL	KLINIK	INDIKATION/DIAGNOSE	DRAINAGE
-----	-----	-----	-----
20	CHIR.UNIV.KLINIK (PROF.HEBERER)	CHOLEDOCHUSREVISION n. CHOLEZYSTEKTOMIE	T-DRAINAGE
2	"	PANKREAS-CARCINOM	PTC-KATHE TER
1	II.MED.KLINIK GH (PROF.PAUMGARTNER)	LEBER-ECHINOKOKKUS	PTC-KATHE TER
1	"	PANKREAS-CARCINOM	PTC-KATHE TER
1	MARIA-THERESIA-KL. (PROF.SCHAUDIG)	MAGEN-CARCINOM	PTC-KATHE TER
1	"	CHOLEDOCHUSREVISION	T-DRAINAGE

T A B E L L E 3: Herkunft der Galleflüssigkeit zur BGP-Isolierung

4.1.2 Antiseren

Die Anti-BGP-Seren, die für den RIA und die Affinitätschromatographie-Säule benötigt wurden, waren eigene Präparationen. Zur Überprüfung auf Verunreinigungen des Extraktes sowie der jeweiligen Säulenfraktionen wurden mono- und polyvalente Antiseren gegen menschliche Serumproteine (Fa.BEHRINGWERKE, Marburg) benutzt. Zur Überprüfung der BGP-Präparationen wurden ferner labor-eigene monospezifische Antiseren vom Kaninchen gegen CEA, NCA und gegen gemeinsame Antigendeterminanten (kreuzreagierende Anti-CEA-Seren) eingesetzt.

4.1.3 RIA-Standard

Als RIA-Standard diente eine eigene vorgereinigte BGP-Präparation (Bili CON A/3; C 45/3).

4.2 Untersuchtes Patientengut

Die Serum- und Galleproben stammten von Patienten der folgenden Kliniken:

- MED.KLINIK I,II,III: KLINIKUM GROBHADERN
- CHIR.UNIV.KLINIK : KLINIKUM GROBHADERN
- MED.KLINIK INNENSTADT
- II.MED.KLINIK SCHWABING

4.2.1 Normalkollektiv

Das Normalkollektiv setzte sich aus 110 Bundeswehrrekruten im Alter von 18 - 22 Jahren sowie aus 13 zusätzlichen Probanden im Alter von 20 bis 40 Jahren (männlich/weiblich: 3/10) zusammen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestand bei keinem der Probanden klinisch oder klinisch-chemisch Anhalt für eine bestehende Erkrankung. Es waren alle Blutgruppen des A-B-O-Systems vertreten.

4.2.2 Patienten mit nicht malignen Erkrankungen

Tabelle 4 gibt Überblick über das Patientengut mit nicht malignen Erkrankungen.

Bei allen Patienten mit Leberzirrhose, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa war die Diagnose histologisch gesichert. Die akuten Hepatitiden waren in allen Fällen klinisch, klinisch-chemisch sowie in einer Vielzahl der Fälle radioimmunologisch (A/B-Hepatitis-Serologie) nachgewiesen. Die Diagnose der primär biliären Zirrhose war in allen Fällen klinisch-chemisch (Transaminasen, Immunglobuline, antimitochondriale Antikörper), meistens auch histologisch gesichert. Gleiches gilt für die Pankreatitis und die chronische Hepatitis.

<u>DIAGNOSE</u>	<u>ZAHL DER PAT.</u>	<u>GESCHLECHTSVERT.</u> (M/W)	<u>ALTERSVERT.</u>
LEBERZIRRHOSE	86	62/24	24-73 J.
PRIM.BIL.ZIRRHOSE	20	5/15	28-77 J.
HEPATITIS,AKUT	117	69/48	18-75 J.
HEPATITIS,CHRON.	20	11/9	25-75 J.
MORBUS CROHN	20	10/10	21-60 J.
COLITIS ULCEROSA	18	6/12	16-71 J.
PANKREATITIS	18	12/6	34-88 J.

T A B E L L E 4: Patienten mit nicht malignen Erkrankungen

4.2.3 Patienten mit malignen Erkrankungen

Primäres Leberzell-Karzinom

Der BGP-Spiegel wurde bei 54 Patienten mit histologisch oder/und laparoskopisch gesichertem primärem Leberzell-Karzinom untersucht. In 43 Fällen wurde diese Diagnose durch einen teilweise massiv erhöhten AFP-Spiegel untermauert. Das Kollektiv zeigte eine Geschlechtsverteilung von 37/17 (M/F). Es waren alle Altersstufen von 3 bis 82 Jahren vertreten.

Pankreas-Karzinom

51 Patienten mit der histologisch, laparoskopisch oder röntgenologisch gesicherten Diagnose des Pankreas-Karzinoms zeigten eine Altersverteilung von 34 bis 78 Jahren und ein Geschlechtsverhältnis von 27/24 (M/F).

Gallenwegs-Karzinom

Bei 22 Patienten mit Gallenblasen- oder Gallengangs-Karzinom war die Diagnose histologisch durch Endoskopie oder Laparoskopie erfolgt. Bis auf eine Ausnahme (16 J.) waren die Patienten im Alter von 44 bis 87 Jahren, das Verhältnis Männer zu Frauen betrug 10 zu 12.

Colon-Karzinom

In Serumproben von 26 Patienten mit Dickdarm-Karzinom wurde der BGP-Spiegel bestimmt. Die 13 Frauen und 13 Männer waren zwischen 23 und 83 Jahre alt. Die Diagnose war durch Probepunktion während einer Endoskopie oder Laparotomie histologisch gesichert, in 21 Fällen war der CEA-Spiegel stark erhöht.

Bronchial-Karzinom

11 Fälle mit Bronchial-Karzinom (Männer/Frauen: 8/3) im Alter zwischen 33 und 67 Jahren wurden untersucht.

Lebermetastasen

Bei einem Kollektiv von 41 Patienten (23 M., 18 F.) im Alter von 29 bis 81 Jahren bestanden histologisch, laparoskopisch oder szintigraphisch gesicherte Lebermetastasen folgender Primärtumoren: Colon-Karzinom(6), Magen-Karzinom(2), Mamma-Karzinom(3), Pankreas-Karzinom(5), Leiomyosarkom(4), unbekannter Primärtumor(21).

4.2.4 Untersuchungen von Galleproben

Es wurden 137 Galleproben untersucht, entnommen aus dem Ductus choledochus während endoskopisch retrograder Cholangio-(pankreatiko) graphien, die zur Testung der Pankreasfunktion durchgeführt wurden. Die Hälfte der Proben (Galle 1) wurde vor der Stimulation des Pankreas durch Sekretin und Pankreozymin entnommen, die andere danach (Galle 2).

5 ERGEBNISSE

5.1 Methodischer Teil

5.1.1 Galle - Extraktion

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen im Flußdiagramm die in der Methodik genauer beschriebene Extraktion bzw. Präparation von BGP. Nach der dargelegten Folge von Perchlorsäure-Extraktion, Zentrifugation, Dialyse und Lyophilisation bzw. Einfrieren wurden etwa 60 Liter Galle verarbeitet.

Aus Abbildung 3 wird ersichtlich, welche kreuzreagierenden Antigene oder Verunreinigungen in dem PCA-Extrakt mit der OUCHTERLONY-Methode nachzuweisen waren. Bei Testung gegen Antihumanserum AHS zeigten sich entsprechend der unterschiedlichen Molekülgröße und Konzentration der verunreinigenden Serumproteine mehrere starke Präzipitationslinien. Als wesentliche Serumproteine konnten Albumin, Alpha₁-Antitrypsin und Alpha₁-Glykoprotein (Antikörper gegen die beiden letzten Proteine in Antiserum Nr.40 und 41 enthalten) nachgewiesen werden.

Auch die mit BGP kreuzreagierenden Antigene CEA und NCA konnten in der OUCHTERLONY-Testung in mehr oder weniger starker Reaktion dargestellt werden. Keine Präzipitationslinie fand sich bei Testung mit einem Antiserum gegen normalen Colonschleimhautextrakt (A-NE). Als Hauptpräzipitationslinie zeigte sich mit einem Antiserum gegen kreuzreagierende CEA-Antigene (A-CEACLE/3) eine identische Reaktion mit nicht absorbiertem Anti-NCA-Serum (A-NCA), wohingegen ein absorbiertes Anti-CEA-Serum (Nr. 32) keine bzw. nur eine Spur Reaktion aufwies.



A B B I L D U N G 1: Flußdiagramm der Galle-Extraktion

BGP - ISOLIERUNG

B. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

GALLE-EXTRAKT: BILI-PCA

DEAE - SEPHACEL

FRAKTION D I D II

CON A - SEPHAROSE

FRAKTION 1 2 3

CNBR-AKTIVIERTE SEPHAROSE 4B (A-"NCA", A-BGP NR. 45)

FRAKTION 1 2 3

HPLC: TSK 545 DEAE

FRAKTION 1 2

HPLC: TSK - G 4000 SWG

FRAKTION 1 2

B G P

RADIOIMUNOASSAY ¹²⁵J-BGP

DOPPELANTIKÖRPERTEST

2. AK.: 1. AK

ANTI-KAN: IgG

IMMUNISIERUNG

ANTI-BGP-ANTISERUM

ABSORPTION MIT HS + A,B - ERY

PROTEIN A-SEPHAROSE CL-4B

1 2 3

CLE

1 2

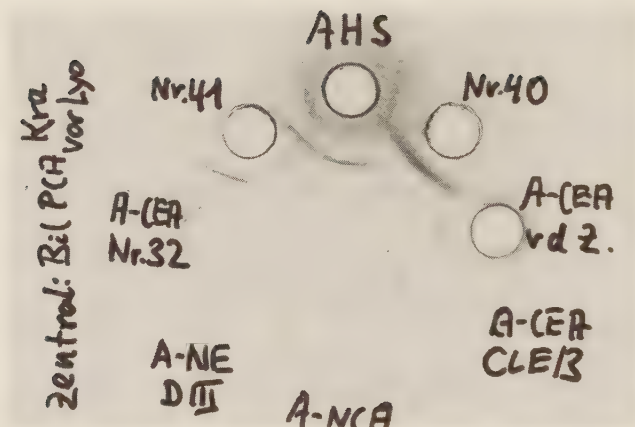
CCEA

1 2

ANTI-BGP-IGG SPEZIFISCH (NR. 47)
VOM KANINCHEN

ABBILDUNG 2

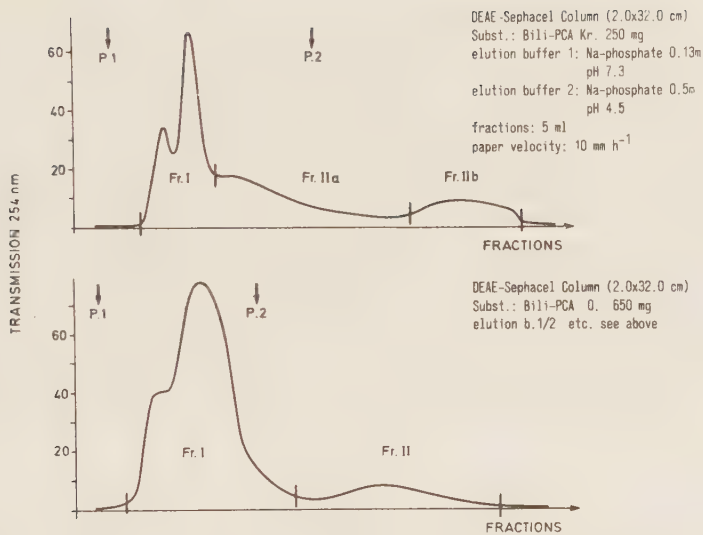
ABBILDUNG 2: Flußdiagramm der säulenchromatographischen Trennung zur BGP-Isolierung



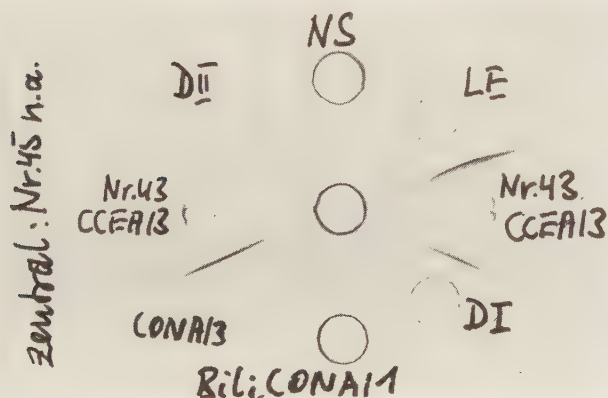
A B B I L D U N G 3: Doppeldiffusion-Testung des PCA-Extrakts gegen Verunreinigungen

5.1.2 Reinigung des Antigens

Zunächst wurde zur chromatographischen Auftrennung des Galleextrakts mit einer DEAE - Sephacel - Anionenaustauschersäule gearbeitet. Wie die in Abbildung 4 dargestellten Chromatogramme zeigen, konnte das Eluat hauptsächlich in 2 Fraktionen unterteilt werden, die als D I (Fr. I und IIa) und D II (Fr. II bzw. IIb) bezeichnet wurden. Die entsprechende OUCHTERLONY-Untersuchung (Abbildung 5) der beiden gesammelten und eingeeengten Lösungen ergab bei Testung gegen noch nicht monospezifisches Anti-BGP-Serum (Nr. 45) einen deutlichen Antigennachweis in Fraktion D I, in Fraktion D II hingegen war nur mit Anti-NCA-Serum (kreuz-reagierend) eine schwache Präzipitationslinie nachweisbar. Um einen Antigenverlust bei der Vorreinigung auszuschließen, wurden



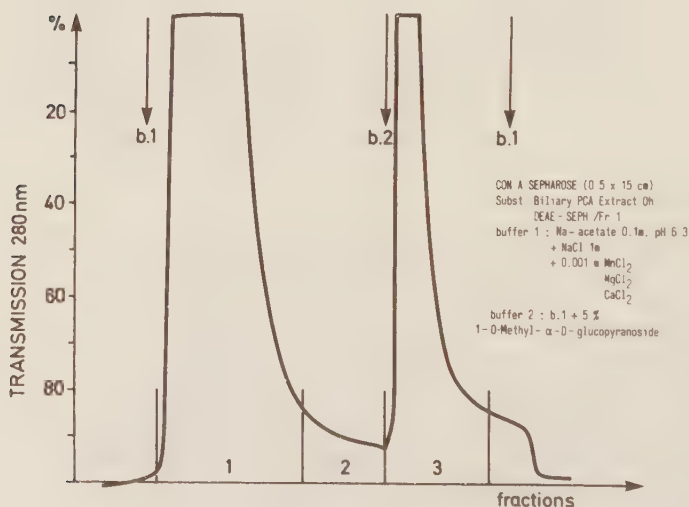
AB B I L D U N G 4 : Anionenaustauscherchromatographie des Galle-Perchlorsäure-Extrakts



AB B I L D U N G 5 : Doppeldiffusion-Testung von DI und DII, CON A/1 und CON A/3 gegen Anti-BGP-Serum

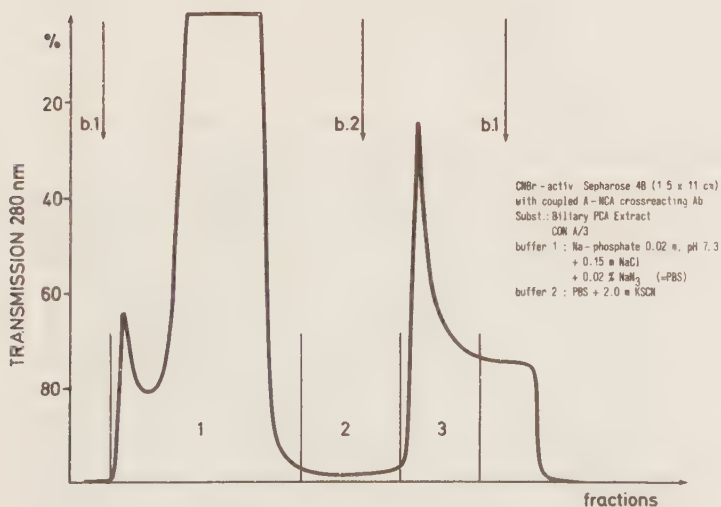
D I und D II in allen Präparationen gepoolt und als D Σ weiterverarbeitet.

Als nächster Reinigungsschritt schloß sich die kohlehydrat-spezifische Affinitätschromatographie an. Zu diesem Zweck wurde D Σ auf eine Concanavalin A - Säule aufgetragen und in die Fraktionen der beiden Hauptpeaks CON A/1 sowie CON A/3 aufgetrennt gesammelt und auf ihren Antigengehalt geprüft. In Abbildung 6 ist ein typisches Diagramm dieser CON A-Säule wiedergegeben. Nach Abbildung 5 reagierte lediglich CON A/3 mit Anti-BGP-Serum und war somit für die weitere Isolierung von BGP geeignet.

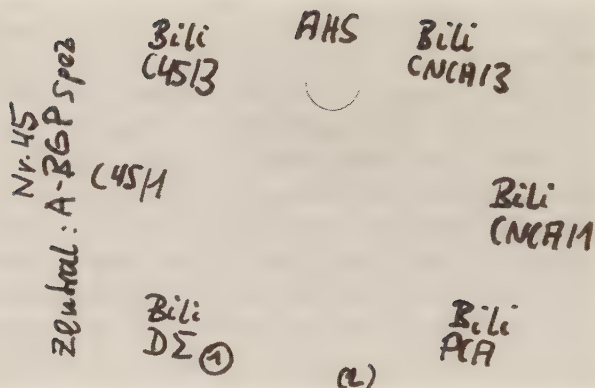


AB B I L D U N G 6 : Affinitätschromatographische Auftrennung von BGP

Wie bereits in der Methodik erläutert, wurden anfangs in Ermangelung eines spezifischen Antikörpers nur kreuzreagierende Antikörper aus Anti-NCA-Seren benützt. Die CON A - gebundene Proteinlösung wurde auf eine Säule mit CnBr-aktivierter Sepharose aufgetragen, an die die kreuzreagierenden Antikörper gekoppelt waren. Die Fraktionen der Hauptpeaks (Abbildung 7) CNCA/1 und CNCA/3 wurden mittels OUCHTERLONY-Doppeldiffusion auf ihre Reaktion mit Anti-BGP geprüft, wobei sich nur für CNCA/3 eine Präzipitationslinie zeigte (Abbildung 8). Die Nicht-Reaktivität von Antiserum Nr. 45 gegen Galleextrakt (Bili PCA) und die Vorfraktion D Σ ist durch die hohe Spezifität nach Absorption und die dadurch bedingte Antikörperverdünnung erklärlich.



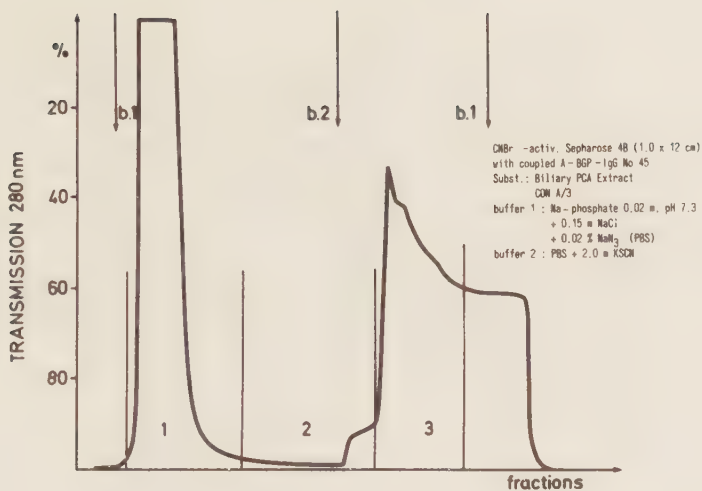
A B B I L D U N G 7 : Immunaффinitätschromatographische
Auftrennung von BGP mittels A-NCA



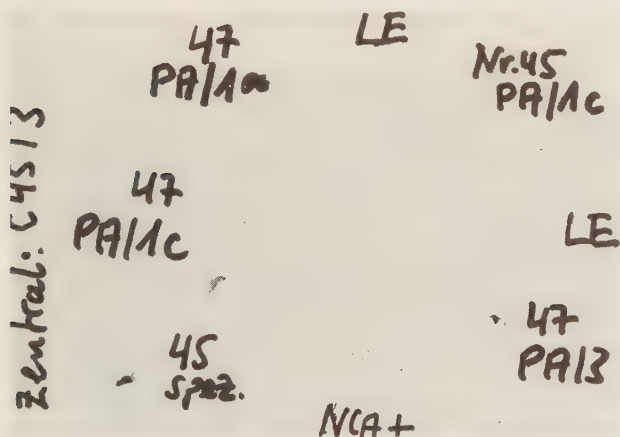
A B B I L D U N G 8 : Doppeldiffusion-Testung der Fraktionen CNCA/1 und CNCA/3 gegen Anti-BGP

Als nach der ersten Immunisierung ein selbst hergestelltes Antiserum gegen BGP (Nr.45) zur Verfügung stand, wurde die Anti-"NCA"-Säule durch eine Anti-BGP-Säule (CnBr-aktivierte Sepharose mit angekoppeltem monospezifischen Anti-BGP-IgG) ersetzt (Säule Nr. 45). Das an diese Säule gebundene und in der Fraktion 3 (C45/3) wieder eluierte Proteingemisch (Abbildung 9 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm) zeigte bei der Testung im OUCHTERLONY-Verfahren (Abbildung 10) eine deutliche Reaktion mit Anti-BGP (Nr.45 spez., Nr.47 PA/3), beide Antiseren jedoch keine Reaktion mehr mit dem kreuzreagierenden NCA (LE, NCA+).

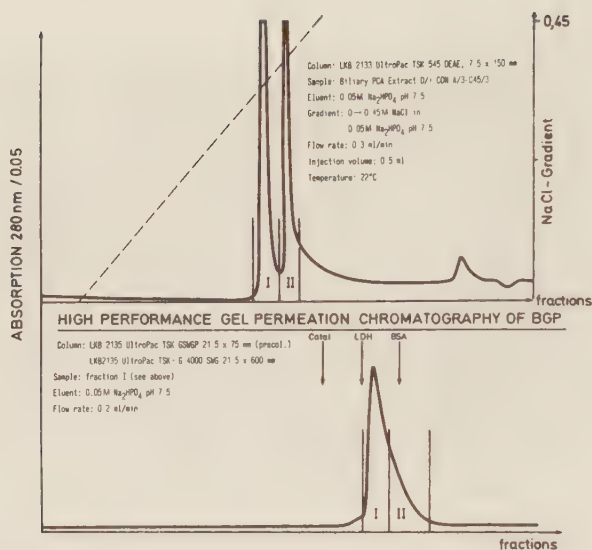
Zur weiteren Trennung der proteinhaltigen Fraktionen CNCA/3 sowie C45/3 wurde als letzter Isolierungsschritt mit der High Performance Liquid Chromatographie gearbeitet. Mittels einer entsprechenden DEAE-Anionenaustauschersäule wurden CNCA/3 und C45/3 in jeweils 2 Hauptpeaks aufgetrennt (Abbildung 11 oben). Bei Testung gegen den monospezifischen Antikörper Nr. 45 spez. ergab sich für die Fraktionen BC-DEAE I ein deutlicher Antigen-nachweis (Abbildung 12), während in den Fraktionen BC-DEAE II



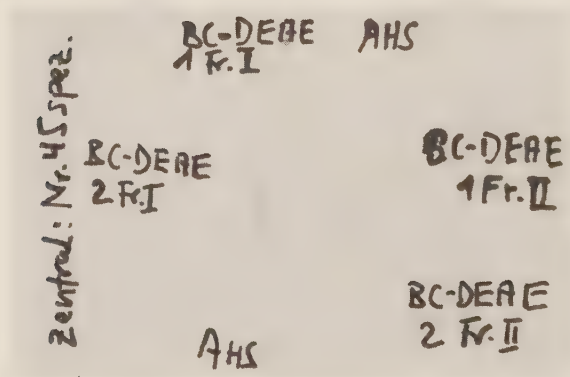
A B B I L D U N G 9 : Immunaффinitätschromatographische
Auftrennung von BGP mittels A-BGP



A B B I L D U N G 10 : Doppeldiffusion-Testung von C45/1 und
C45/3 (Anti-BGP-Säule) gegen A-BGP



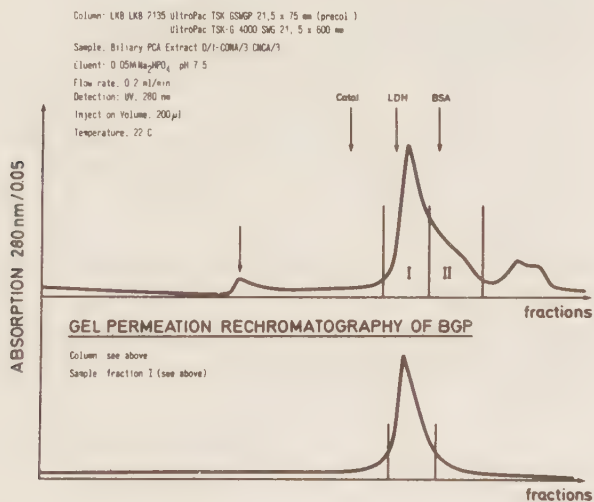
A B B I L D U N G 11 : HPLC-Anionenaustauscherchromatographie von BGP (BC DEAE)



A B B I L D U N G 12 : Doppeldiffusion-Testung von BC DEAE I+III gegen monospezifisches Anti-BGP Nr. 45

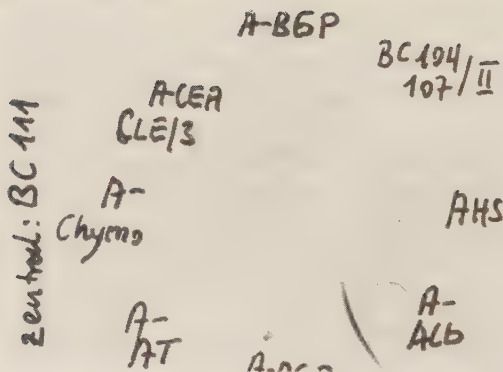
nur eine schwache Präzipitationslinie mit Anti-BGP-Serum, aber eine zusätzliche mit Antihumanserum vorhanden war.

Fraktion I der High Performance Anion Exchange Chromatography wurde schließlich noch der High Performance Gel Permeation unterworfen und das Eluat in 2 Fraktionen unterteilt, von denen Fraktion I als Tracer-Material für den Radioimmunoassay bzw. zur Immunisierung für ein spezifisches Anti-BGP-Serum (Nr. 47) verwandt wurde (Abbildung 11 und 13).



A B B I L D U N G 13 : Chromatographische Auftrennung von BGP mittels HPLC Gelfiltration

Die nächste Abbildung zeigt die Prüfung dieser Fraktion in der OUCHTERLONY-Doppeldiffusion (Abbildung 14). Weder mit Antiserum gegen Humanserum (AHS), Albumin (A-Alb), Alpha¹-Glykoprotein (AGP), noch mit Antiserum gegen die ursprünglich im Extrakt vorhandenen



A B B I L D U N G 14 :Doppeldiffusion-Testung von BC 111 gegen Verunreinigung mit Serumproteinen

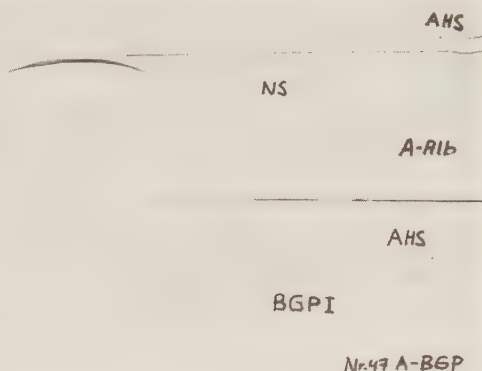
menschlichen Serumproteine Alpha₁-Chymotrypsin (A-Chymo) und Alpha₁-Antitrypsin (A-AT) zeigte sich eine Reaktion, eine deutliche Präzipitationslinie war aber mit dem spezifischen Anti-BGP-Serum und kreuzreagierenden A-CEA (A-CEA CLE/3) zu erkennen.

5.1.3 Charakterisierung von BGP

Physikalisch-chemische Eigenschaften

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, wird das biliäre Glykoprotein BGP bei der Auftrennung nach Molekulargewicht auf einer High Performance Gel Permeations- Chromatographiesäule zwischen den Markerproteinen LDH (MG 146000) und dem bovinen Serumalbumin BSA (MG 67000) und deutlich nach der Catalase als Protein von hohem Molekulargewicht (MG 232000) eluiert. Demnach betrug das apparente Molekulargewicht für BGP bei Auftrennung mit dieser Säule etwa 107×10^3 Daltons.

In der Immunelektrophorese wandert das biliäre Glykoprotein im Vergleich zu Normalserum zwischen Transferrin und Albumin, und weist somit eine alpha - Mobilität¹ auf (Abbildung 15).

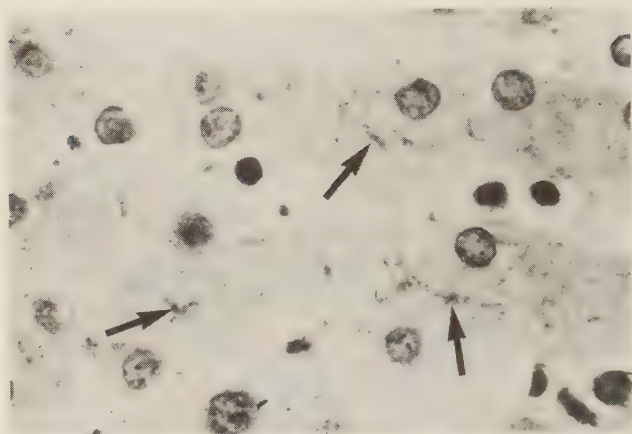


A B B I L D U N G 15 : Immunelektrophoretische Auftrennung von BGP im Vergleich zu Normalserum

Lokalisation von BGP

Bei der histologischen Untersuchung² von Leberschnitten mittels Anti-BGP-IgG vom Kaninchen (Nr. 45/47) nach der Immunperoxydasemethode zeigt sich eine deutliche Anfärbung ausschließlich im Bereich der Canaliculi (Abbildung 16, Pfeil) und Gallenkanälchen.

-
- 1 Die Untersuchung erfolgte im Immunologielabor der Klin. Chemie GH; Laborleiter Prof. Dr. Fateh-Moghadam
 - 2 Wir danken Herrn Schüppel für die im Rahmen seiner Inaugurationsdissertation erfolgten histologischen Untersuchung (Path. Inst. d. Univ. München)



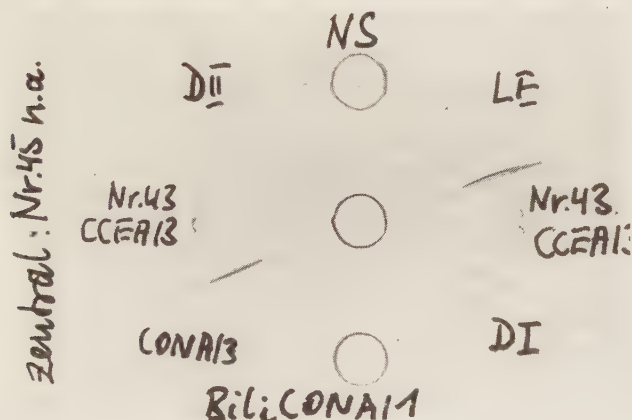
A B B I L D U N G 16 : Histologische Untersuchung von Leber-
schnitten zur Ermittlung der Lokalisation
von BGP

5.1.4 Herstellung von Antiseren

Es wurden 2 Kaninchen mit BGP-haltigem Material immuni-
siert. Die zur Immunisierung verwandten BGP-Präparationen sind
aus folgendem Schema ersichtlich:

Hase	Immunisierungs- substanz	AS(ml)	Absorption	Beurteilung
Nr.45	BC 83/84 + 88 Sammelfraktion von CNCA/3	65	+5mgNS/mlAS + A/B Ery	gutes AS
Nr.47	BC 97/98 + 99 Sammelfraktion von C45/3	60	+5mgNS/mlAS + A/B Ery	gutes AS

10 Tage nach Abschluß der Immunisierung wurde eine Blutprobe entnommen und das Serum in der OUCHTERLONY-Doppeldiffusion auf eine immunologische Reaktion mit dem verabreichten Antigen untersucht. Das Resultat der Testung war in beiden Fällen positiv, so daß die Kaninchen entblutet werden konnten, wobei 60 bzw. 65 ml Serum gewonnen wurden. Anschließend wurden die beiden Antiseren durch Absorptionsreihen mit Normalserum (NS), Perchlorsäure-Lungenextrakt (LE) und CEA im OUCHTERLONY getestet, ob und womit absorbiert werden mußte.



AB B I L D U N G 17 : Doppeldiffusion-Testung des nicht absorbierten Antiserums Nr. 45

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, zeigt nicht absorbiertes Antiserum Nr. 45 eine Präzipitationslinie gegen LE, die eine immunologische Identitätsreaktion mit kreuzreagierenden Antikörpern eines NCA - Serums aufweist (Nr. 43 CCEA/3). Im Ansatz gegen die vorgereinigten Fraktionen D I, D II und CON A/3 zeigen sich 2 angedeutete Präzipitationslinien, von denen die eine komplette Identität mit der Antikörperlinie gegen NCA aufweist, während die zweite auf Kreuzreaktion mit BGP hinweist. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei Prüfung von dem nicht

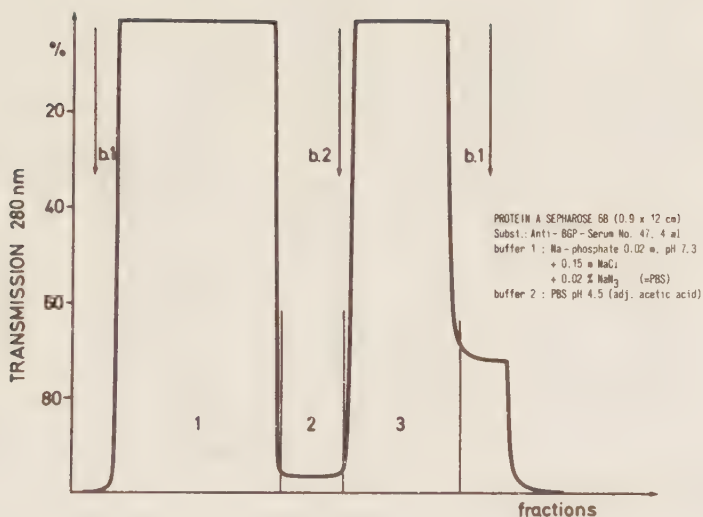
absorbierten Antiserum Nr. 47 (Abbildung 18). Hier ist die deutliche partielle Identitätsreaktion dieses Antiserums im Ansatz gegen LE und der gereinigten BGP - Präparation C45/3 im Sinne einer Spornbildung noch besser sichtbar. Die Präzipitationslinie gegen LE zeigt eine vollständige Identitätsreaktion mit dem spezifischen Anti - NCA - Serum (Nr.43 spez. oben), die Präzipitationslinie gegen C45/3 eine ebensolche vollkommene Identitätsreaktion mit dem spezifischen Anti - BGP - Serum Nr. 45. Trotz negativer Reaktion mit Normalserum wurden die Antiseren mit 5mg Normalserum pro ml Antiserum absorbiert. Anschließend erfolgte die Absorption der dekomplementierten Antiseren mit AB-Erythrozyten, bis auf dem Objektträger mikroskopisch keine Agglutination mehr festzustellen war.

Nr.43 spez.

Zentral: Nr.47 n.a. A-BGP	LE	CEAT
	(45/ 3	Bili PCA
	Nr.45 spez.	DJ
	CONA/3	

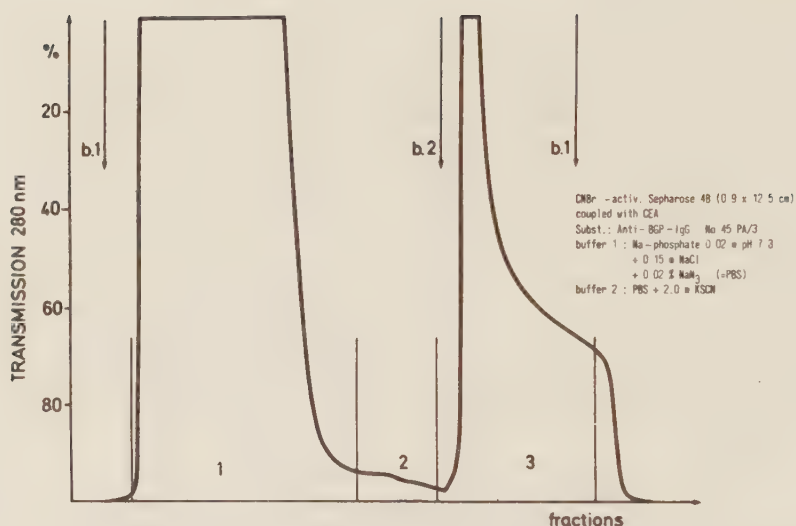
A B B I L D U N G 18 : Doppeldiffusion-Testung des nicht absorbierten Antiserums Nr. 47

Zur Gewinnung einer reinen IgG-Fraktion wurde das Antiserum auf eine Protein A-Sepharosesäule aufgetragen. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 19 dargestellt, nach Anschließen des Desorptionspuffers erscheint in der Fraktion PA/3 die gewünschte IgG-Lösung.



A B B I L D U N G 19 : Affinitätschromatographische Auftrennung von Anti-BGP-Serum Nr. 47 mittels Protein A-Sepharose

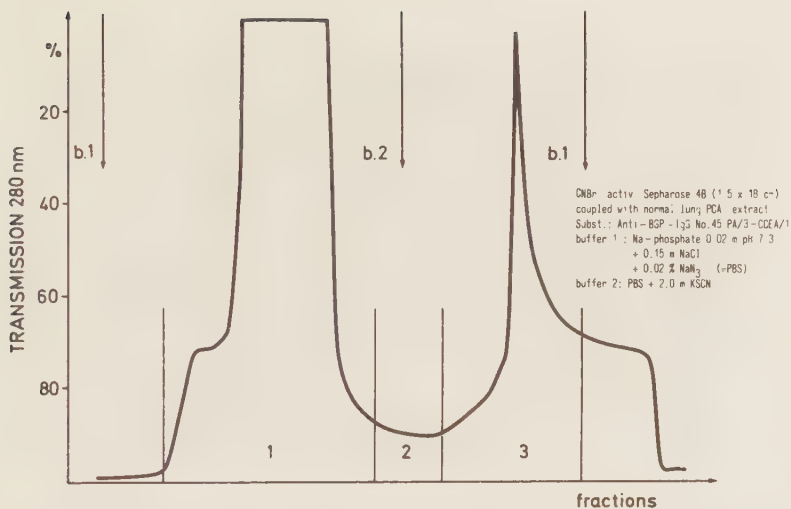
Um die Antikörperlösung nun noch von den mit CEA und NCA kreuzreagierenden Antikörpern gegen CEA und NCA zu reinigen, wurde als nächster und letzter Schritt mit den jeweiligen Immunabsorptionssäulen gearbeitet. Zunächst wurde die Fraktion PA/3 auf eine CnBr-aktivierte Sepharose-4B-Säule mit angekoppeltem carcinoembryonalen Antigen (CEEA) gegeben; die nicht mit CEA kreuzreagierenden Antikörper wurden in Fraktion I eluiert. (Abbildung 20 zeigt ein typisches Chromatogramm), die unerwünschten kreuzreagierenden Antikörper zunächst an die CEA-Säule gebunden und erst nach Pufferwechsel mit der Fraktion 3 eluiert.



A B B I L D U N G 20 : Säulenchromatographische Auftrennung von Anti-BGP auf einer Immunabsorptionssäule mit angekoppeltem CEA

Zur Beseitigung der Kreuzreaktion mit NCA wurde die Fraktion Anti-BGP-IgG Nr. 45PA/3-CCEA/1 auf eine CnBr-aktivierte Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem Lungenextrakt (CLE) gegeben. Die gewünschte ungebundene Fraktion erschien wiederum gleich zu Beginn (Abbildung 21), doch bei Testung dieser Fraktion (Nr.45PA/3-CCEA/1-CLE/1) in der OUCHTERLONY-Doppeldiffusion zeigte sich immer noch eine Präzipitationslinie gegen Lungenextrakt LE (Abbildung 22 oben rechts), die erst nach nochmaliger Absorption auf der CLE - Säule verschwand (Abbildung 22 unten rechts).

In Abbildung 23 wird am Beispiel des spezifischen Anti-BGP-IgG Nr.45 demonstriert, daß nach der durchlaufenen Absorptionsreihe mit NS, CEA und LE keinerlei Reaktionen mit diesen Substanzen mehr nachweisbar sind (linke Seite der Abbildung), und es sich hierbei ebenso wie bei dem Anti-BGP-Serum Nr. 47 um ein immuno-



A B B I L D U N G 21 : Säulenchromatographische Auftrennung von Anti-BGP auf einer Immunabsorptionssäule mit angekoppeltem Lungenextrakt (NCA-CLE)

Nr. 45 PA/1c

Nr. 45 PA/3 CLE/1

LE

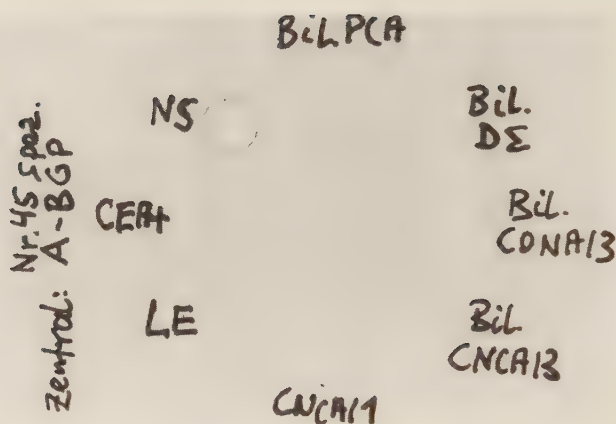
Nr. 45 PA/3 CLE/1 (2x)

CEA+

Zentral: CLEA/13

Bili: CLEA/13

A B B I L D U N G 22 : Doppeldiffusion-Testung von Anti-BGP nach Immunabsorption mit LE (Nr. 45 PA/3 CLE/1)



A B B I L D U N G 23 : Doppeldiffusion-Testung des absorbierten, spezifischen Anti-BGP-Serums

logisch reines, monospezifisches Antiserum handelt, das das biliäre Glykoprotein in der Reihenfolge der erfolgten Reinigungsschritte bis hin zur immunabsorbierten CNCA/3-Fraktion nachweist (rechte Seite).

5.1.5 RIA

5.1.5.1 Markierung

Die für die Markierung verwandte BGP - Präparation stammte von der Fraktion I der High Performance Gel Permeations-Chromatography (immunologisch reines BGP). Dieses im Reaktionspuffer (0,5 M Na-Phosphatpuffer) gelöste BGP I enthielt etwa 10 ug/20 ul, die mit 0,3 mCi ^{125}J markiert wurden.

Die nach Abschluß der Markierung erforderliche Reinigung des Tracers ist an einem typischen Beispiel in Abbildung 24 wiedergegeben. Zunächst wurde die markierte Substanz mit Hilfe einer

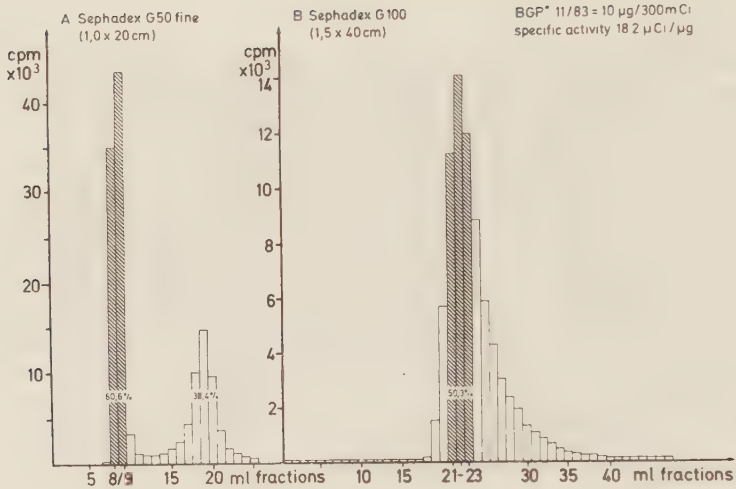
Sephadex G 50-Säule aufgetrennt. Als erstes wurde das Protein in einem Peak mit 61% der eingesetzten Aktivität eluiert, anschließend dann das nicht gebundene freie ^{125}J in einem breiteren und flacheren Salzpeak. Lediglich die zwei zentralen Fraktionen des steilen Proteinpeaks wurden zur Weiterverarbeitung herangezogen, gepoolt und auf einer Sephadex G 100 - Säule rechromatographiert. Das dabei erhaltene Aktivitätschromatogramm zeigte nur noch einen Gipfel mit steilem Anstieg und allmählichem Abfall. Fraktion 21 - 23 zeigten mit 50,3% den höchsten Aktivitätsgehalt (Abbildung 24 rechts) und wurden für die Antikörperverdünnungsreihe verwandt.

5.1.5.2 Antikörperverdünnungskurve

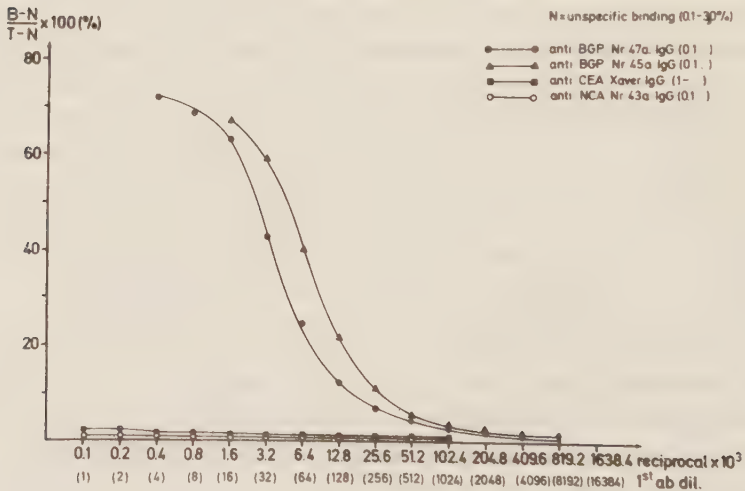
Die drei bei der Markierung gepoolten Fraktionen der Sephadex G 100 - Säule wurden in Antikörperverdünnungsreihen auf ihre Immunreaktivität geprüft. Dazu wurde der Tracer nach der Berechnung durch das Markierungs-Rechenprogramm mit RIA-Verdünnungspuffer auf eine Endkonzentration von 15000 counts/min eingestellt. Als Antiserum dienten die selbst hergestellten Anti-BGP-IgG-Lösungen in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:20480000. In Abbildung 25 sind die Antikörperverdünnungskurven für die monospezifischen Antiseren Nr.45 und Nr.47 dargestellt. Beide Kurven zeigen einen parallelen Verlauf, wobei aus der seitlichen Verschiebung hervorgeht, daß Antiserum Nr.45 stärker bindet als Nr.47. Die 50% - Bindung lag für Nr.47 bei einer Antikörperverdünnung von 1:3200, für Nr.45 hingegen bei 1:6400.

Wie ebenfalls aus Abbildung 25 hervorgeht, zeigte sich bei der Untersuchung des Tracers mit Anti-NCA und Anti-CEA keine Bindung, was für die Reinheit der BGP-Präparation beweisend ist.

Ferner wurde der BGP - Tracer auf eine Reaktion mit Anti-Lipoprotein X (Serum vom Kaninchen), Anti-Secretory-Piece (IgA-Verbindungsstück, Serum vom Kaninchen), Anti-Procollagen III (Serum vom Kaninchen) und Anti- α_1 -Orosomucosid (Serum vom Kaninchen) getestet: in allen Fällen war keine bzw. eine ange-



A B B I L D U N G 24 : Reinigung des Tracers nach Abschluß der Markierung von BGP mit ¹²⁵J



A B B I L D U N G 25 : Antikörperverdünnungskurven der monospezifischen Antiseren Nr.45 und 47

deutete maximale Bindung von 5% nachweisbar.

In Abbildung 25 sind die Antikörperverdünnungskurven der Antiseren Nr.45 und Nr.47 beim Ansatz gegen den BGP - Tracer wiedergegeben. Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigen beide Antiseren vergleichende Antikörperbindungskurven mit dem steilsten Anstieg im Verdünnungsbereich zwischen 1:25000 und 1:1600. Für den RIA wurde aufgrund dieser Bindungskurve eine Antikörperverdünnung von Antiserum Nr.45 von 1:4600 hergestellt.

Anti - BGP - Seren

In Abbildung 26 und 27 sind die Bindungscharakteristiken der beiden Anti-BGP-(IgG-Präparationen) Seren Nr.45 und Nr.47 vergleichend nach dem Scatchard-Plot (54) dargestellt. Danach ließen sich in Antiserum Nr.45 eine stark bindende Antikörperfraktion mit einer Bindungskonstanten von $1,18 \times 10^{10}$ l/Mol und einer Konzentration von $6,58 \times 10^{-11}$ Mol/l und eine schwach bindende Fraktion mit einem K_a von $2,75 \times 10^9$ l/Mol ($C_a = 9,63 \times 10^{-11}$ Mol/l) nachweisen; für das schwächere Antiserum Nr.47 betrugen die entsprechenden Parameter-Werte für $K_{a\max} = 8,74 \times 10^9$ l/Mol ($C_{a\max} = 8,53 \times 10^{-11}$ Mol/l) und für $K_{a\min} = 7,28 \times 10^8$ l/Mol ($C_{a\min} = 3,17 \times 10^{-10}$ Mol/l).

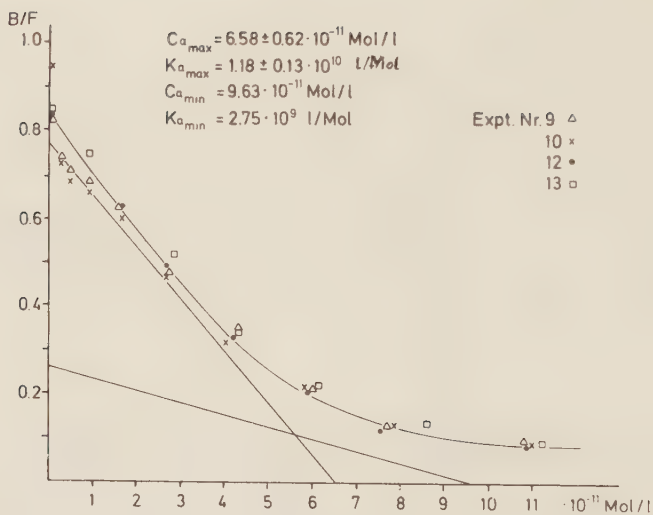


ABBILDUNG 26 : Scatchard-Plot des Anti-BGP-Serums Nr.45

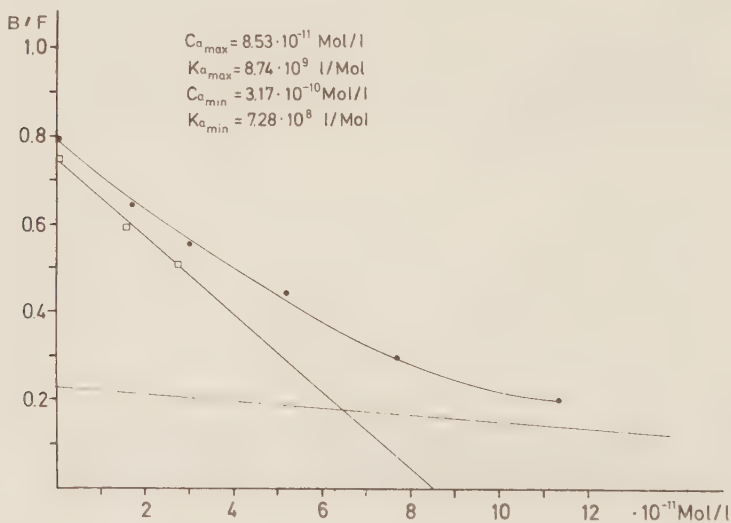


ABBILDUNG 27 : Scatchard-Plot des Anti-BGP-Serums Nr.47

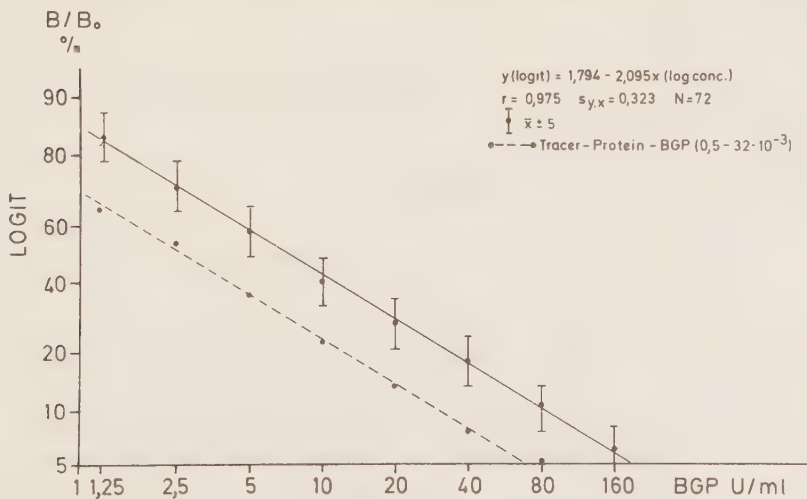
5.1.5.3 Standard - Inhibitionskurve

Als Standard wurde eine eigene vorgereinigte Fraktion benutzt (C 45/3), als 1. Antikörper diente ein eigenes Anti-BGP-Serum in geeigneter Verdünnung.

In Abbildung 28 sind die Standard-Verdünnungskurven von 9 BGP-Radioimmunoassays nach dem Logit-Log-Verfahren wiedergegeben.

Mittelwerte, Streuungen und Variationskoeffizienten der Standardbindungsaktivitäten von 9 BGP-Radioimmunoassays
(1. AK: Nr.45; 2. AK: v. d. Ziege 1/10)

STD	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160
$\bar{x}$	83,53	71,91	57,66	40,42	27,57	18,50	10,45	6,07
s	4,52	6,99	8,48	7,87	6,84	5,10	2,81	1,90
VK	(5,4%)	(9,7%)	(14,7%)	(19,5%)	(24,8%)	(27,6%)	(26,9%)	(31,3%)



AB B I L D U N G 28 : Standardverdünnungskurven von 9 BGP-RIAS

5.2 Klinischer Teil

Sämtliche klinischen BGP-Werte gehen aus den Verteilungsdiagrammen in Abbildung 29 und 30 sowie aus den umgekehrten relativen Häufigkeits-Verteilungskurven in Abbildung 31 und 32 hervor.

In Tabelle 5 sind die statistischen Berechnungen für alle BGP-Werte zusammengefaßt, in den Tabellen 7-14 sind die Werte anderer klinischer Parameter einschließlich BGP bei kleineren Kollektiven der einzelnen Krankheitsgruppen zusammengefaßt (N =Anzahl; $\bar{x}$ =Mittelwert; s =Streuung; $VK\%$ =Variationskoeffizient).

5.2.1 BGP - Spiegel unterschiedlicher Kollektive

5.2.1.1 BGP - Spiegel bei Normalpersonen

Wie aus den oben genannten Abbildungen ersichtlich ist, lagen bei dem Kollektiv von 123 Normalpersonen alle BGP-Werte im Bereich zwischen 2,3 und 14 U/ml bei einem Mittelwert von 8,8 U/ml und einer Streuung von 2,2 U/ml. Bezüglich etwaiger Altersdifferenzen kann keine Aussage gemacht werden, da nur Seren von Normalpersonen im Alter von 20 bis 45 Jahren zur Verfügung standen.

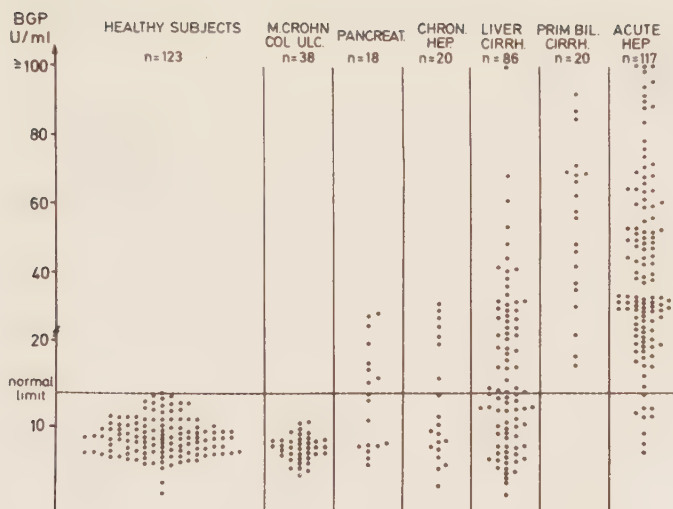
In dem Kollektiv befanden sich auch 10 Seren von gesunden Frauen, wobei kein signifikanter geschlechtsabhängiger Unterschied nachzuweisen war.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die obere Normgrenze für den BGP-RIA auf 14 U/ml festgelegt.

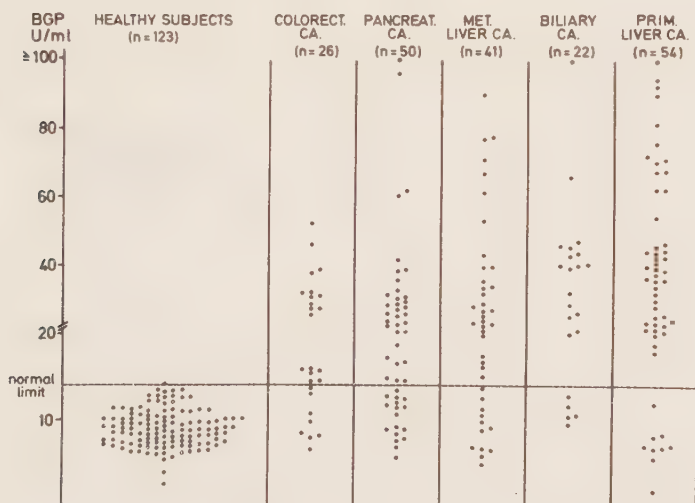
5.2.1.2 BGP-Spiegel bei Personen mit benignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

MORBUS CROHN - COLITIS ULCEROSA

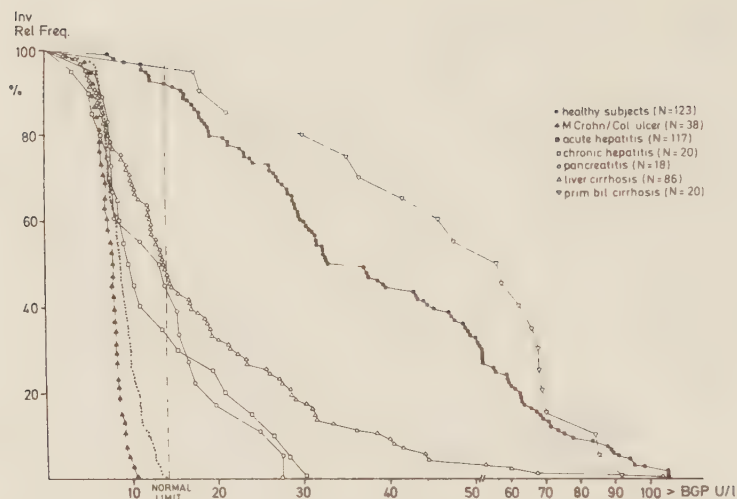
Wie aus den Abbildungen 29 und 31 für benigne Erkrankungen hervorgeht, lagen die BGP-Werte des gesamten Kollektivs von 38 Patienten mit einem Mittelwert von $7,5 \pm 1,4$ U/ml im Normbereich und folgten auch einer Normalverteilung.



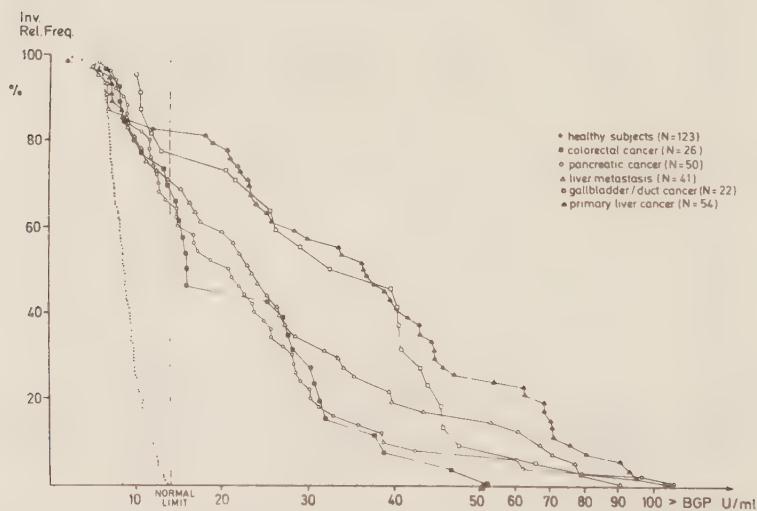
A B B I L D U N G 29 : BGP-Serumspiegel bei Patienten mit benignen Erkrankungen



A B B I L D U N G 30 : BGP-Serumspiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen



A B B I L D U N G 31 : Umgekehrte relative Häufigkeits-Verteilungskurve bei benignen Erkrankungen



A B B I L D U N G 32 : Umgekehrte relative Häufigkeits-Verteilungskurve bei malignen Erkrankungen

KOLLEKTIV	N	10.PZ	$\bar{x}$	$\bar{x}$	S	VK%	90.PZ
NORMAL SERUM	123	6,2	8,7	8,8	2,2	24,5	11,9
M. CROHN/COL. JUC.	38	5,3	7,5	7,5	1,4	19,4	10,1
CHRON. HEPATITIS	20	5,0	10,0	13,4	8,4	63,0	27,5
PANKREATITIS	18	6,3	13,3	14,0	7,2	51,5	25,5
LEBERZIRRIOSE	86	5,6	13,7*	20,2	21,4	105,9	37,5*
AKUTE HEPATITIS	117	15,5	34,2*	42,3	24,8	58,7	72,7*
PRIM. BIL. ZIRRIOSE	20	20,0	57,5	53,5	22,7	42,4	85,0
COLON-CARCINOM	26	7,6	18,8	22,2	12,7	57,2	38,5
PANKREAS-CARCINOM	50	6,3	20,7	25,3	22,6	89,3	40,0
LEBERMETASTASEN	41	7,2	23,5	29,1	22,2	76,4	69,5
GALLENKES-CARCINOM	22	12,8	32,5*	40,3	44	109,1	48,6*
PRIM. LEBERZELL-CARCINOM	54	6,7	35,0	39,7	25,8	65,1	79,0
NORMAL GALLE	10	116,7	170,0	188,1	73,1	38,9	325,0
GALLE 1	137	7,2	26,6	39,8	34,7	87,3	102,6
GALLE 2	137	9,1	22,2	31,2	25,9	83,1	66,5

*=nach Ausschluß von 1-3 Extremwerten

TABELLE 5 : BGP-Spiegel im Serum von Normalpersonen, Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie in Galleproben

PANKREATITIS

Bei diesem Kollektiv von 18 Patienten mit Pankreatitis lag der Median im Bereich der oberen Normgrenze bei 13,3 U/ml; 45% der Fälle waren über die Norm erhöht, wobei das 90. Perzentil bei 25,5 U/ml zu lokalisieren war und die Verteilungskurve mit einem 10. Perzentil von 6,3 U/ml links-steil verlief.

Von den anderen in Tabelle 6 angeführten Parametern war AFP in den meisten Fällen, CEA überwiegend normal, während bezüglich der Cholestase-Parameter γ -Gt, aP und Bilirubin nur 2 bzw. 3 der 11 untersuchten Fälle pathologische Spiegel aufwiesen.

TABELLE 6: Wichtige Parameter bei dem Kollektiv* Pankreatitis*

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	γ -GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
M.R.	63	5,7	2,0	2	11,5	104	0,84
G.H.	34	6,4			9,0	97	0,90
H.B.	64	7,1	2,0	6	15,9	131	0,64
D.I.	51	7,6	2,0		9,0	64	0,40
L.M.	45	7,9	2,0		9,0	69	0,89
S.H.	38	10,8	2,0		13,0	92	0,48
H.R.	66	13,2	4,8		6,9	147	1,23
H.J.	52	15,2	11,0	6	477,0	710	1,30
S.F.	67	17,3	2,0		16,0	169	0,30
D.G.	88	24,9	3,0	3	6,3	240	2,70
S.P.	77	27,4	2,0		287,0	594	6,10
N	11	11	10	4	11	11	11
$\bar{x}$	58,6	13,0	3,2	4,3	78,2	219,7	1,4
s	16,4	7,5	2,9	2,0	156,1	221,0	1,7
VK%	28,0	57,6	87,1	48,5	199,6	100,6	117,2

CHRONISCHE HEPATITIS

Die BGP-Serumspiegel bei den 20 Patienten mit chronischer Hepatitis waren ähnlich wie bei dem Pankreatitis-Kollektiv (siehe Abbildung 31) verteilt. Der Median lag bei 10,00 U/ml, wobei etwa 35% der BGP-Werte über die Norm erhöht waren. Die Verteilungskurve zeigte ebenfalls einen linkssteilen, doch im Vergleich mit der Pankreatitis weiter gespannten Verlauf (10. PZ 5,0; 90. PZ 27,5 U/ml). Von den übrigen in Tabelle 7 aufgeführten Parametern waren AFP und CEA in den untersuchten Fällen immer normal, während von den Cholestase-Parametern die γ -Gt- und die aP-Aktivitäten deutlich bis z.T. stark erhöht waren.

TABELLE 7: Wichtige Parameter b.d. Kollektiv "chron. Hepatitis"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	γ -GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
T.A.	57	3,0	2,0	4	19,0	112	1,62
F.W.	69	5,0	2,0	3	8,0	68	1,10
H.O.	68	5,3	2,0	3	91,0	443	0,90
V.E.	75	6,4	2,0	3	8,0	76	0,76
H.A.	44	7,2	2,0	4	4,0	46	0,65
K.P.	66	7,4	2,0	3	34,5	112	0,68
P.R.	55	8,2	2,0	3	82,0	79	7,90
H.U.	76	9,0	2,0	12	17,6	218	2,86
J.N.	25	10,1	2,0	3	55,0	163	1,10
P.R.	65	10,9			83,8		8,00
I.H.	68	13,6	2,0	3	86,0	169	9,00
L.H.	32	15,3	2,7	8	50,0	262	21,80
S.H.	62	15,4	3,0	7	86,0	168	8,00
L.P.	47	23,9	2,0	8	77,0	174	13,50
S.H.	67	26,5	4,0	3	42,0	174	6,60

NAME	ALTER	BGP	CEA	AFP	Y-GT	AP	BILI
N	15	15	14	14	15	14	15
$\bar{x}$	57,8	11,1	2,3	4,8	49,6	161,7	5,6
s	15,1	6,8	0,6	2,8	32,9	101,5	6,0
VK%	26,1	60,9	26,0	53,2	66,3	62,8	107,4

LEBERZIRRHOSE

Bei einem Kollektiv von 86 Patienten mit Leberzirrhose wurde der Serum-BGP-Spiegel gemessen. Der Median war bei 13,7 U/ml einzuordnen, 50% der Werte lagen noch im Normbereich, oberhalb der Normgrenze von 14 U/ml waren die BGP-Spiegel zum Teil stark erhöht (siehe Abbildung 29 und 31), so daß sich wiederum eine typisch linkssteile Verteilungskurve ergab (10.PZ: 5,6 U/ml; 90.PZ: 37,5 U/ml). Von den übrigen mituntersuchten Parametern waren CEA und AFP im Mittel nur leicht erhöht, während von den Cholestase-Parametern im Mittel das Bilirubin mäßig und die γ -Gt- und die aP-Aktivitäten deutlich bis zum Teil stark erhöht waren.

TABELLE 8: Wichtige Parameter bei dem Kollektiv "Leberzirrhose"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
G.B.	58	19,2	2,0	30	52	149	1,04
G.H.	50	27,3	2,0	4	51	253	3,71
G.E.	66	20,2	2,0	7	110	87	0,80
B.W.	53	3,4	2,0	7	42	200	3,00
E.E.	42	28,6	2,3	8	400	250	1,50
F.M.	65	13,7	2,0	27	65	112	0,90
A.K.	51	7,6	3,2	3	71	114	1,70
B.G.	62	9,9	5,3	3	24	164	8,60

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	YGT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
E.H.	44	25,8	3,2	3	1060	488	5,80
D.M.	55	6,4	2,0	3	46	144	1,80
B.H.	70	14,4	4,1	5	123	520	1,70
B.A.	51	10,2			74	401	0,90
A.I.	32	30,7	2,0	7	250	258	6,80
B.R.	61	17,8	7,5	3	126	87	1,90
E.A.	41	172,2	3,7	3	2290	309	1,90
S.B.	45	10,0	2,0	12	55	136	2,90
D.H.	47	26,7	5,0	3	90	331	0,90
B.A.	45	7,0	2,0	3	543	87	3,00
B.J.	29	9,2	2,0	3	39	209	
G.H.	37	11,8	14,0	5	46	186	0,65
G.M.	39	12,8	2,0	3	119	530	1,90
S.G.	40	8,9	2,0	5	37		1,50
G.M.	73	12,2	2,3	3	152	288	13,00
S.A.	58	7,6	2,0	3	90	87	9,39
R.K.	44	33,7	5,7	5	627	531	0,90
S.F.	73	11,9	4,3	4	54	107	3,40
S.W.	59	10,7	3,1	7	48	197	1,80
S.J.	51	18,7	6,9	5	225	199	19,90
S.F.	57	5,0	2,0	4	24	136	0,90
S.R.	61	13,9	2,2	5	121	379	2,84
F.M.	45	28,6	4,0	3	218	246	11,20
H.R.	61	44,2	2,0	8	110	305	7,80
G.F.	67	18,4	7,1	128	47	148	3,90
H.A.	73	53,1	4,0	5	1000	6000	50,00
B.L.	44	9,7	2,5	5	47	97	2,57
K.G.	41	41,8	5,3	8	179	446	10,40
W.M.	70	31,6	2,0	4	216	1080	1,70
G.A.	50	13,3	2,0	5	233	198	4,32
E.H.	61	29,1	8,6	22	316	669	9,50
F.G.	60	12,2	4,5	10	97	86	1,30

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
M.W.	44	21,4	2,7	5	202	318	8,50
H.K.	53	22,4			112	105	13,50
K.A.	44	36,1	2,0	3	880	2700	35,30
L.F.	58	13,7	2,6	330	37	166	9,30
F.M.	58	23,4	2,0	3	64	948	4,40
M.B.	44	5,8	8,2	3	9	119	8,80
B.K.	37	21,5	7,0	7	37	195	12,60
K.E.	52	9,3	2,0	3	54	111	4,10
G.R.	46	5,9	2,0	3	102	469	13,00
H.O.	53	23,4	2,0	112	51	280	6,60
H.P.	49	16,8	5,0	7	103	284	11,40
S.J.	61	16,7			190	380	4,00
Z.H.	46	5,2	2,0	4	6	66	1,73
J.G.	70	12,2	2,0	3	91	89	0,90
M.M.	63	11,9	2,4	15	63	200	3,00
P.E.	64	15,6	6,0	238	120	351	2,10
J.D.	40	12,8	13,0	4	662	378	9,20
W.R.	56	14,2	2,0	7	159	229	3,56
W.K.	47	12,0	2,0	3	36	166	2,20
D.R.	47	19,1	2,0	7	103	97	1,70

N	62	62	59	59	62	61	61
$\bar{x}$	52,9	20,6	3,7	19,5	217,9	402,6	6,2
s	10,7	22,8	2,7	55,1	363,3	817,2	8,2
VK%	20,3	110,7	72,2	281,8	166,7	203,0	131,4

PRIMÄR BILIÄRE ZIRRHOSE

Es konnten die Seren von 20 Patienten mit diesem Krankheits-

bild untersucht werden. Wie aus den Abbildungen 29 und 31 hervorgeht, fand sich ausnahmslos eine mehr oder weniger starke Erhöhung der BGP-Spiegel, wobei der Median bei 57,5 U/ml zu lokalisieren war. Das Kollektiv war annähernd normal verteilt, wobei die entsprechende Kurve einen leicht rechtssteilen Verlauf zeigte (10.PZ: 20,0 U/ml; 90.PZ: 85,0 U/ml).

Von den mitbestimmten übrigen Parametern war CEA nur in 2 Fällen deutlich erhöht, AFP nur in einem Fall. Von den Cholestase-Parametern war Bilirubin in 2/3 der Fälle mässig und in 3 Fällen deutlich erhöht, die γ -Gt nur in einem Fall grenzwertig normal, sonst deutlich bis stark erhöht, ebenso die aP in einem Fall grenzwertig normal und in 6 Fällen über 1000 U/ml stark erhöht.

TABELLE 9: Wichtige Parameter bei dem Kollektiv "PBZ"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	γ -GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
G.F.	50	17,1	2,0	45	445	1090	2,50
G.G.	38	17,8			125	309	1,50
D.H.	40	29,9	6,2	11	78	184	10,50
M.M.	56	34,9			127	796	6,70
R.T.	60	36,2			223	676	1,00
E.I.	52	45,6			245	564	0,80
H.W.	77	47,4	38,0	5	28	217	0,90
H.H.	45	55,9			630	1110	1,20
R.G.	50	56,8			508	1162	1,00
S.R.	58	62,5			121	807	0,60
W.C.	54	66,1	2,0	3	134	988	22,10
S.O.	47	67,4	2,2	8	165	422	12,50
B.D.	57	67,6	2,4	3	89	359	0,90
B.J.	66	68,1	12,0	3	75	219	0,80
K.A.	43	70,4			460	1085	1,40
P.M.	49	84,6	3,6	3	168	1220	2,40
D.H.	55	92,0	2,0	3	291	937	2,50

NAME	ALTER	BGP	CEA	AFP	Y-GT	AP	BILI
N	18	18	10	10	18	18	18
$\bar{x}$	53,7	55,9	7,5	9,0	219,4	734,7	4,12
s	10,1	22,3	11,2	12,9	177,4	370,3	5,7
VK%	18,8	39,9	148,5	143,7	80,9	50,4	139,7

AKUTE HEPATITIS

Die bei 117 Patienten mit akuter Hepatitis bestimmten BGP-Serumkonzentrationen ergaben ebenfalls hohe pathologische Konzentrationen mit einem Median von 34,2 U/ml. Lediglich 9 Werte lagen unterhalb der Normgrenze, die höchsten BGP-Spiegel bei 100 U/ml. Das Kollektiv folgte einer linkssteil verlaufenden Verteilungskurve (10.PZ:15,5 U/ml; 90.PZ: 72,7 U/ml).

Von den übrigen bestimmten Parametern war CEA in 5/14 Fällen leicht bis mäßig erhöht, AFP in 10/25 Fällen. Von den Cholestase-Parametern war die γ -Gt nur in 3/25 Seren erhöht, davon 2mal grenzwertig und einmal mit 70 U/ml. Ebenso war die aP nur in einem Fall (321 U/ml) von 25 untersuchten Fällen erhöht. Demgegenüber war das Bilirubin nur bei 3/25 Fällen normal und in den übrigen erhöht, davon in 8 Seren über 5 und in 4 Seren über 10 mg%.

TABELLE 10: Wichtige Parameter b.d.Kollektiv "ak.Hepatitis"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
H.E.	36	11,0	8,4	9	28	135	0,30
M.C.	26	18,6		42	19	110	11,60
N.G.	35	20,8		11	14	38	1,42
O.M.	34	22,5	2,0	4	14	111	1,31

NAME	AL TER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
K.G.	30	23,0	2,0	6	16	71	7,40
G.W.	60	23,9	2,0	18	13	24	1,61
L.M.	30	27,7	2,0	31	20	112	0,94
G.M.	30	31,1	2,0	9	20	37	2,82
S.H.	29	51,1		11	20	93	1,14
S.R.	24	32,2		2	23	31	1,29
K.C.	35	37,4	3,2	7	16	118	3,21
B.M.	71	38,7	2,0	21	31	94	25,30
G.S.	34	39,6	2,0	15	16	37	3,20
H.U.	65	42,8	9,2	169	30	71	9,23
S.J.	23	43,2		48	20	55	5,95
S.H.	36	44,2	6,0	14	15	104	10,30
M.W.	50	47,5	3,0	25	15	42	0,86
S.G.	38	51,4	3,0	7	24	321	20,60
V.W.	44	51,8		5	19	86	1,28
Z.J.	40	59,2		60	25	54	4,85
F.A.	62	67,8	4,0	83	70	40	3,00
W.H.	28	71,2		3	20	125	0,50
S.O.	42	84,2		9	13	122	5,50
U.M.	72	92,0		16	20	105	3,22
W.K.	26	104,9		380	11	42	0,85

N	25	25	14	25	25	25	25
$\bar{x}$	39,6	44,7	3,6	40,2	21,3	83,9	5,1
s	15,1	23,9	2,5	79,3	11,4	44,6	6,3
VK%	38,2	53,3	68,0	169,9	53,8	53,2	122,8

5.2.1.3 BGP-Spiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

DICKDARM-KARZINOM

Es wurden die BGP-Serumkonzentrationen von 26 Patienten mit der histologisch gesicherten Diagnose eines kolorektalen Tumors bestimmt. Bei diesem Kollektiv war in den meisten Fällen eine zusätzliche Lebermetastasierung vorhanden.

Der Median lag bei einer BGP-Konzentration von 18,8 U/ml, wobei etwa 30% der Werte im Normbereich lagen, weitere 30% mit einer Konzentration bis 16 U/ml nur geringfügig erhöht waren und die restlichen 40% der Fälle im Bereich zwischen 25 und 50 U/ml einzuordnen waren (siehe Abbildung 30 und 32).

Von den übrigen untersuchten Parametern war CEA nur in 2/12 untersuchten Fällen normal, während in 5 Fällen Konzentrationen über 1000 ng/ml vorlagen. AFP war in den untersuchten 6 Fällen normal. Von den Cholestase-Parametern war die γ -Gt in 9/13 Fällen erhöht, davon 6mal über 100 U/ml. Die aP war in 4/13 Fällen normal, in den übrigen Fällen erhöht, davon 5mal über 500 U/ml. Das Bilirubin zeigte in 7/13 Fällen normale Konzentrationen, von den erhöhten Spiegeln lag nur 2mal eine Konzentration über 5 mg% vor.

TABELLE 11: Wichtige Parameter b.d.Kollektiv "Colon-Ca"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	γ -GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
R.L.	52	38,7	14,0	5	532	830	1,29
R.R.	68	6,4	2,0		7	73	5,13
B.M.	44	30,7	1700,0	3	386	706	1,70
F.K.	53	31,3	3200,0		76	215	0,67
B.A.	65	28,1	4750,0		188	438	1,48

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
B.H.	56	14,5	1454,0		146	239	0,49
B.F.	69	10,6	167,0		5	91	0,60
A.R.	33	52,3			98	397	2,63
F.K.	59	13,1	1059,0		21	172	0,94
A.F.	57	8,3	2,0	4	21	85	1,00
B.M.	45	27,6	69,0	5	344	782	13,70
A.M.	55	14,3	190,0	3	71	674	0,56
C.H.	55	25,2	332,0	8	499	562	1,00

N	13	13	12	6	13	13	13
$\bar{x}$	54,0	23,2	1086,6	4,7	184,2	405,0	2,4
s	9,5	13,4	1514,8	2,7	190,7	279,9	3,6
VK%	17,7	57,8	139,4	39,9	103,6	69,1	151,2

PANKREAS-KARZINOM

Es konnten Seren von 50 Patienten mit Pankreas-Karzinom im BGP-RIA untersucht werden. Lediglich in 17 Fällen lag der BGP-Spiegel im Normbereich, die übrigen Werte waren bei einem Median von 20,7 U/ml teilweise bis auf über 100 U/ml erhöht. Die Verteilungskurve nahm bei einem 10.Perzentil von 6,3 U/ml und einem 90.Perzentil von 40,0 U/ml einen linkssteilen Verlauf.

Von den übrigen Parametern war CEA in 14/37 Fällen normal, bei den restlichen erhöht, davon 24mal gl./gr.10 und 15mal über 25 ng/ml. AFP war in 23/24 untersuchten Fällen normal und einmal auf über 8000 ng/ml erhöht. Von den Cholestaseparametern war die γ -Gt in 5/40 Fällen normal, von den erhöhten Konzentrationen lag 23mal ein Wert über 100 U/ml bis maxi-

mal 1370 U/ml vor. Ebenso lag bei der aP nur 6mal von 40 untersuchten Fällen ein normaler Aktivitäts-Spiegel vor, in 17 Fällen lag die Aktivitätserhöhung über 500 U/ml. Beim Bilirubin fand sich in 18/40 untersuchten Fällen eine normale Konzentration, von den erhöhten Werten lag 7mal ein Wert über 10 mg% vor.

TABELLE 12: Wichtige Parameter b.d. Kollektiv "Pankreas-Ca"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
S.M.	52	4,6	99,0	3	122	515	17,00
K.S.	52	8,8	3,0		84	270	0,60
K.M.	60	16,7	620,0	8	201	348	1,60
A.H.	70	30,2	2,0		376	454	3,70
S.H.	71	96,9	2,2		1370	370	18,70
B.I.	61	29,1	6,6	8140	382	801	1,40
W.M.	68	38,5	21,0		554	720	14,60
H.G.	46	6,7	2,0	3	87	99	13,10
L.A.	60	23,6	17,0	3	386	1580	17,60
G.H.	51	60,5	4,0	3	314	510	7,16
N.E.	50	26,1	22,0		78	326	1,20
K.M.	59	23,5	3,2		291	713	7,97
K.M.	71	24,9	211,0		490	663	22,90
F.Z.	89	42,9			280	1270	12,90
B.R.	42	32,9	2,0	4	536	618	4,20
R.H.	65	28,3	9,3	7	124	359	3,50
K.H.	71	17,1	431,0	4	201	1456	0,63
H.J.	59	9,0	2,1		71	92	0,52
H.M.	78	25,7	34,2	3	709	1094	10,80
V.J.	51	11,7	2,7		117	348	0,85
E.R.	55	14,6	2,0	3	98	263	0,93
S.E.	47	11,5	2,0	3	16	86	0,60

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
H.R.	42	28,3	2,0	6	73	742	7,76
W.E.	44	28,6	2,0	3	26	219	0,62
S.H.	71	7,4	4,3	4	24	177	0,90
H.W.	34	21,9	4,0	2	223	576	0,80
H.A.	64	10,5	3,0	3	42	267	1,00
B.E.	66	31,2			388	749	0,50
W.K.	71	38,7	5,3		453	252	4,70
K.L.	72	22,5	5,3	3	6	807	2,34
M.H.	41	62,2			790	1143	1,62
H.J.	65	11,5	3,8		65	372	0,50
M.A.	60	18,7	237,0	5	166	431	0,90
H.R.	68	12,4	2,0	10	19	96	0,48
W.E.	44	14,8	2,0	3	36	219	0,62
N.E.	50	16,6	10,0		79	326	1,20
S.A.	52	42,4	1044,0	3	504	1550	1,23
S.M.	58	12,6	47,0	3	70	235	0,61
H.W.	34	21,1	4,0	2	223	576	0,80
S.A.	57	8,3	5,0		70	195	0,40

N	40	40	37	24	40	40	40
$\bar{x}$	58,0	25,1	77,8	343,4	253,9	529,0	4,7
s	12,3	17,6	207,6	1660,7	272,0	408,9	6,2
VK%	21,2	70,2	266,8	483,6	107,2	77,3	131,3

LEBERMETASTASEN

Bei einem Kollektiv von 41 Patienten mit der gesicherten Diagnose von Lebermetastasen bei Primärtumoren unklarer Genese konn-

te der BGP-Spiegel gemessen werden. Wie aus Abbildung 32 hervorgeht, nimmt die umgekehrte relative Häufigkeitsverteilungskurve einen ähnlichen Verlauf wie bei dem Kollektiv mit Pankreas-Karzinom. In etwa 30% der Fälle lag die BGP-Konzentration im Normbereich, im übrigen waren die Werte bei einem Median von 23,5 U/ml bis auf 90 U/ml erhöht. Die Verteilungskurve zeigte einen linkssteilen Verlauf.

Von den übrigen untersuchten Parametern lag in 17/27 untersuchten Fällen eine normale CEA-Konzentration vor, von den erhöhten Werten 7mal eine Konzentration über 10 und 2mal über 100 ng/ml. AFP war in 21/26 untersuchten Fällen normal und wies 5mal eine Konzentration bis maximal 169 ng/ml auf. Von den Cholestase-Parametern lag in 5/29 Fällen eine normale γ -Gt-Aktivität vor, bei den übrigen fanden sich erhöhte Werte, davon 12mal größer 100 U/ml bis maximal 532 U/ml. Die aP war in 8/29 Fällen normal und in 21 Fällen erhöht, davon 9mal über 100 und 3mal über 1000 bis maximal 1137 U/ml. Das Bilirubin war in 15/29 Fällen normal, in den übrigen Fällen erhöht, davon 8mal über 5 mg% bis maximal 25 mg%.

TABELLE 13: Wichtige Parameter b. d. Kollektiv "Lebermetastasen"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
M.S.	76	21,2			76	386	8,00
M.F.	76	76,0	2,0	81	70	600	9,00
M.I.	63	71,0	2,0	4	362	1137	5,80
M.E.	78	77,2	2,0	4	259	459	1,30
L.H.	65	53,3	3,6	11	139	270	0,70
K.A.	61	33,5	15,0	3	100	349	1,20
B.G.	58	26,6	22,0	5	30	116	0,67
W.A.	52	39,6	2,0	53	190	541	8,92
S.K.	59	77,8	632,0	3	49	706	0,90
M.F.	76	61,3	2,0	81	70	600	9,00

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-Gt U/L	AP U/L	BILI MG/DL
R.L.	52	17,4	21,0	3	532	830	1,29
Z.L.	67	11,2	62,0	4	47	144	0,64
M.W.	57	23,4	2,0	3	61	396	1,40
S.H.	49	10,5	6,5	7	16	320	0,49
D.G.	29	8,7	2,0	3	180	1096	0,60
L.J.	61	25,1	2,0	4	75	533	0,48
U.R.	60	27,3	2,0	169	92	112	6,04
F.R.	44	26,3			170	1106	10,40
I.K.	48	6,5	2,0	3	15	100	0,40
B.M.	78	5,6	2,0	5	17	190	0,90
M.K.	78	16,2	2,3	6	219	257	1,20
L.V.	71	13,7	2,0	3	151	197	0,50
E.A.	42	90,0	2,0		40	163	0,40
B.K.	66	35,5	336,0	8	505	391	1,96
M.T.	54	39,4	24,0	3	170	470	25,10
S.H.	54	6,4	2,0.	7	14	158	0,50
M.F.	30	9,8	2,7	3	70	301	0,70
N.O.	52	4,8	2,0	9	16	82	0,50
G.H.	38	22,9	5,8	52	74	501	0,80

N	29	29	27	26	29	29	29
$\bar{x}$	56,6	32,0	42,7	20,7	131,8	431,4	3,4
s	16,9	25,0	134,2	38,3	135,3	304,1	5,3
VK%	29,9	78,2	314,3	185,3	102,7	70,5	154,2

PRIMÄRES LEBERZELLKARZINOM

Von den 54 untersuchten Patienten mit primärem Leberzellkarzinom lagen die BGP-Konzentrationen lediglich in 9 Fällen im Normbereich. Wie aus den Abbildungen 30 und 32 deutlich hervorgeht, zeigte sich bei 50% der Fälle eine BGP-Erhöhung zwischen 40 und 100 U/ml (Median 35,0 U/ml).

Von den übrigen untersuchten Parametern war CEA in 13/25 untersuchten Fällen normal. Erwartungsgemäß lagen die häufigsten pathologischen und höchsten Konzentrationen beim AFP vor. In 19/25 untersuchten Fällen waren sie erhöht, davon 14mal über 100 und 10mal über 1000 ng/ml bis maximal 36919 ng/ml. Von den Cholestaseparametern war die γ -Gt in allen Fällen erhöht, davon in 19/25 Fällen über 100 bis maximal 1360 U/ml. Die aP war in 3/25 untersuchten Fällen normal, in den übrigen erhöht, davon 7mal über 500 und 5mal über 1000 bis maximal 2890 U/ml. Beim Bilirubin lag in 6/25 untersuchten Fällen eine normale Konzentration vor, in den übrigen Fällen war sie erhöht, davon 7mal über 10 mg% bis maximal 27 mg%.

TABELLE 14: Wichtige Parameter bei dem Kollektiv "PLC"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
W.U.	44	45,6	2,0	5	170	279	3,70
K.F.	78	81,7	5,1	2443	118	440	1,80
B.I.	46	71,2	2,0	3	182	1218	11,20
W.A.	61	36,3	2,0	64	155	385	3,20
P.J.	80	36,2	3,4	11	81	305	2,90
B.W.	65	94,1	4,9	113	329	1050	10,60
M.M.	67	40,1	7,0	5044	194	294	11,50
Ö.M.	72	76,1	13,0	9420	101	351	25,80

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
R.E.	54	6,8	2,9	65	114	202	1,65
S.F.	44	68,1	3,4	16297	436	436	2,70
H.R.	64	23,0	2,1	49	194	319	1,50
S.I.	55	33,8	2,0	183	68	542	10,50
K.S.	59	23,9	2,0	917	76	304	0,60
W.C.	82	62,5	4,8	7	1360	1600	17,40
K.F.	50	5,7	2,0	3	67	351	27,00
K.A.	49	25,6	2,0	1108	61	389	0,90
S.A.	25	7	8,0	9	96	228	0,80
F.A.	63	38,8	3,9	545	239	1040	2,80
H.H.	69	29,8	4,7	15942	139	347	1,30
D.M.	67	42,9	3,0	36919	309	161	1,41
G.J.	61	33,5	2,9	33948	389	765	1,30
S.L.	58	104,0	4,4	16	840	2890	2,49
U.R.	55	25,1	2,1	1890	92	112	0,90
W.W.	61	41,5	136,0	50	347	137	0,91
B.E.	39	20,9	2,7	28000	157	467	0,80

N	25	25	25	25	25	25	25
$\bar{x}$	57,9	43,0	9,1	6122,1	253,7	584,5	5,8
s	12,5	26,7	26,5	11195	284,0	605,1	7,5
VK%	21,6	62,1	290,7	182,9	111,9	103,5	131,1

E

KARZINOME DER GALLENWEGE

Ähnlich wie bei dem Kollektiv mit primärem Leberzellkarzinom fanden sich auch bei den 22 Patienten mit Gallenwegskarzinomen in 17 Fällen (75%) stark erhöhte BGP-Konzentrationen bis zu 100

U/ml (Median 32,5 U/ml).

Von den übrigen Parametern lag in den 5 untersuchten Fällen eine normale AFP-Konzentration vor und von den 6 untersuchten Fällen in 4 Fällen eine normale CEA-Konzentration, in 2 Fällen eine grenzwertige bzw. deutlich erhöhte Konzentration. Von den Cholestaseparametern war die γ -Gt nur in 1/10 untersuchten Fällen normal, die erhöhten Konzentrationen lagen 7mal über 100 bis maximal 255 U/ml. Ebenso war die aP in 2/10 Fällen normal, von den erhöhten Konzentrationen 3mal über 500 bis maximal 1080 U/ml. Die Bilirubin-Spiegel waren in 4/10 Fällen normal, in den übrigen Fällen bis maximal 27,7 mg% erhöht.

TABELLE 15: Wichtige Parameter b.d.Kollektiv "Gallenwegs-Ca"

NAME	ALTER	BGP U/ML	CEA NG/ML	AFP NG/ML	Y-GT U/L	AP U/L	BILI MG/DL
O.S.	69	20,3			91	78	0,60
R.J.	67	40,3			214	489	27,70
H.M.	87	39,5			12	48	0,47
H.G.	56	21,4	2,0	3	163	365	11,80
W.O.	52	25,5	2,0	3	174	409	1,62
W.U.	44	45,6	2,0	5	170	279	3,70
W.M.	70	28,9			216	1080	1,71
H.W.	77	47,4	38,0	5	28	217	0,90
K.F.	48	40,1	3,4	3	255	686	0,90
E.E.	16	25,1	2,5		121	934	1,23

N	10	10	6	5	10	10	10
$\bar{x}$	58,6	33,4	8,3	3,8	144,5	458,5	5,06
s	20,1	10,3	14,6	1,1	80,6	346,4	8,65
VK%	34,3	30,6	175,0	28,8	55,8	75,6	170,8

5.2.1.4 BGP-Spiegel in der Galle

NORMALGALLE

Es konnten 10 Galleproben untersucht werden, die bei gesunden Patienten im Verlauf von endoskopisch retrograden Cholangiographien ohne pathologischen Befund entnommen worden waren. Bei diesem Kollektiv lag der BGP-Wert im Durchschnitt bei $188,1 \pm 73,1$ U/ml, die entsprechende Kurve war normalverteilt.

GALLE 1 und GALLE 2

Bei 137 Patienten wurde im Rahmen von Pankreasfunktionstests jeweils eine Probe des Galle-Pankreas-Sekrets vor (Galle 1) Stimulation mit Pankreozymin/Cholezystokinin entnommen und die zweite Probe danach (Galle 2). Im Durchschnitt lagen die BGP-Werte vor der Stimulation höher (Median 26,6 U/ml bei Galle 1; 22,2 U/ml bei Galle 2). Beide Kurven waren nicht normalverteilt und zeigten einen linkssteilen Verlauf (Galle 1: 10.-90. PZ: 7,2- 102,6 U/ml; Galle 2: 10.-90. PZ: 9,1 - 88,5 U/ml).

5.2.2 Vergleich der BGP-Spiegel der einzelnen Untersuchungskollektive

In Tabelle 5 sind die wichtigsten statistischen Parameter der BGP-Spiegel der untersuchten Patientenkollektive mit benignen bzw. malignen Erkrankungen zusammengestellt.

Tabelle 16 zeigt eine Zusammenstellung der Signifikanzen der

gegeneinander geprüften BGP-Verteilungen der einzelnen Kollektive.

Wie schon aus Tabelle 5 hervorgeht, konnte, ausgehend von den Werten und Verteilungsparametern des Normalkollektivs, eine leichte bis deutliche Zunahme der Mittel- und Medianwerte sowie der 10./90. Perzentile der einzelnen Verteilungskollektive in der Reihenfolge M.Crohn/Col.ulcerosa - Pankreatitis - chron.Hepatitis - Leberzirrhose - prim.bil.Zirrhose - akute Hepatitis sowie bei den malignen Erkrankungen ein Anstieg von den Parametern des Colon-Ca-Kollektivs über Pankreas-Ca, Lebermetastasen, prim.Leberzellkarzinom bis hin zum Gallenwegskarzinom beobachtet werden. Diese in Tabelle 5 gegliederte Folge wurde aufgrund der statistischen Prüfungen der Einzelverteilungen gegeneinander und dem Ergebnis der Signifikanzen aus Tabelle 16 aufgestellt.

Aus den Daten von Tabelle 16 geht deutlich hervor, daß gemäß der Signifikanz-Prüfung die Kollektive mit benigner Erkrankung die mit maligner Erkrankung bezüglich der Verteilung ihrer BGP-Werte einrahmen und mit steigenden BGP-Werten die Reihenfolge M.Crohn/Col.ulcerosa - chron.Hepatitis - Pankreatitis - Leberzirrhose - Colonkarzinom - Pankreaskarzinom - Lebermetastasen - Gallenwegskarzinom - primäres Leberzellkarzinom - akute Hepatitis - primär biliäre Zirrhose einnehmen.

Aufgrund der vergleichenden Ergebnisse aus Tabelle 5 und 16 sowie der Ähnlichkeit der inversen Verteilungskurven aus Abbildung 31 und 32 konnten einzelne Gruppen vereinigter Diagnose-Kollektive gebildet werden: Eine Gruppe mit den höchsten pathologischen BGP-Spiegeln (prim.bil.Zirrhose, akute Hepatitis), eine zweite Gruppe (Gallengangs-Karzinom, prim.Leberzellkarzinom), eine 3. Gruppe (Colon-Ca, Pankreas-Ca, Lebermetastasen) und eine 4. Gruppe mit den geringsten BGP-Spiegel-erhöhungen (Pankreatitis, chron. Hepatitis, Leberzirrhose). Vereinigt man die BGP-Werte der Einzelkollektive einer Gruppe und stellt sie den Werten des Normalkollektivs in Form einer ROC-Kurve (89) gegenüber, ergeben sich für die oben genannten Gruppen vier deutlich unterschiedliche ROC-Kurven, die in Abbildung 33 vergleichend gegenübergestellt sind. Aus dem opti-

KOLLEKTIV	N	10, P7	$\bar{x}$	$\bar{x}$	S	VK%	90, P7
NORMALSERUM	123	6,2	8,8	8,7	2,2	24,5	11,9
M. CROHN/COL. IULC.	38	5,3	7,5	7,5	1,4	19,4	10,1
CHRON. HEPATITIS	20	5,0	13,4	10,0	8,4	63,0	27,5
PANKREATITIS	18	6,3	14,0	13,3	7,2	51,5	23,5
LEBERZIRROSE	86	5,6	20,2	13,7*	21,4	105,9	37,5*
AKUTE HEPATITIS	117	15,5	42,3	34,2*	24,8	58,7	72,7*
PRIM. BILL. ZIRROSE	20	20,0	53,5	57,5	22,7	42,4	85,0
COLON-CARCINOM	26	7,6	22,2	18,8	12,7	57,2	38,5
PANKREAS-CARCINOM	50	6,3	25,3	20,7	22,6	89,3	40,0
LEBERMETASTASEN	41	7,2	29,1	23,5	22,2	76,4	59,5
GALLENWECHS-CARCINOM	22	12,8	40,3	32,5*	44	109,1	48,6*
PRIM. LEBERZELL-CARCINOM	54	6,7	39,7	35,0	25,8	65,1	79,0
NORMALGALLE	10	116,7	188,1	170,0	73,1	38,9	325,0
GALLE 1	137	7,2	39,8	26,6	34,7	87,3	102,6
GALLE 2	137	9,1	31,2	22,2	25,9	83,1	66,5

*nach Anschluß von 1-3 Extremwerten

TABELLE 5: BGP-Spiegel im Serum von Normalpersonen, Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie in Galleproben

T A B E L L E 16 : Signifikanz - Tabelle

	NORMALKOLLEKTIV	M. CROHN/COL. ULC.	CHRON. HEPATITIS	PANKREATITIS	LEBERZIRRHOSE	COLONCARCINOM	PANKREASCARCINOM	LEBERMETASTASEN	PRIM. LIEBERCARCINOM	GALLENWEGSCARCINOM	LEBERMETASTASEN	GALLENWEGSCARCINOM	PRIM. LIEBERCARCINOM	AKUTE HEPATITIS
M. CROHN/COL. ULC.	NS	-												
CHRON. HEPATITIS	+	+	-											
PANKREATITIS	++	++	NS	-										
LEBERZIRRHOSE	5+	5+	NS	NS	-									
COLONCARCINOM	5+	5+	NS	NS	NS	-								
PANKREASCARCINOM	5+	5+	NS	NS	NS	NS	-							
LEBERMETASTASEN	5+	5+	NS	+	+	NS	NS	-						
GALLENWEGSCARCINOM	5+	5+	3+	3+	3+	+	++	NS			NS	-		
PRIM. LIEBERCARCINOM	5+	5+	5+	5+	5+	4+	3+	NS		NS	NS	NS	-	
AKUTE HEPATITIS	5+	5+	5+	5+	5+	3+	5+	+		NS	+	NS	NS	-
PRIM. BIL. ZIRRHOSE	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	3+		+	3+	+	+	+

 $+ < 0,05 / ++ < 0,02 / 3+ < 0,01 / 4+ < 0,005 / 5+ < 0,001$

schen Vergleich geht deutlich hervor, daß die Diskriminanz-Schärfe der ROC-Kurven von Gruppe 1 nach Gruppe 4 abnimmt.

Eine statistische Auswertung dieser ROC-Kurven ergibt, daß der beste Diskriminanz-Grenzpunkt für die einzelnen ROC-Kurven (beste Unterscheidung der jeweiligen Sammelkollektive gegenüber der BGP-Verteilung des Normalkollektivs; maximaler Informationsgehalt) an der oben definierten Normgrenze von 14 U/ml liegt. Die an dieser Stelle ermittelten Chi-Quadrat-Werte für die einzelnen ROC-Kurven nahmen von 222,6 (Gruppe 1) nach 69,3 (Gruppe 4) ab. Aufgrund dieser vergleichenden Untersuchungen kann festgestellt werden, daß die BGP-Verteilungen eine deutliche Unterscheidung zwischen einem Normalkollektiv und den benignen bzw. malignen gastrointestinalen Erkrankungskollektiven erlauben, jedoch keine Diskriminanz zwischen malignen und benignen Erkrankungen.

5.2.3 Korrelation von BGP mit anderen gemessenen Parametern

Es wurde untersucht, ob der BGP-Spiegel in den einzelnen Kollektiven mit zusätzlich ermittelten Cholestase-Parametern (γ -Gt, aP, Bilirubin) oder zwei Tumormarkern (AFP, CEA) in Beziehung steht. Dazu wurden zunächst die linearen Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Diagnosegruppen und Parameter im Vergleich zum BGP berechnet und auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Bei nicht normal verteilten Wertepaaren wurde zusätzlich als parameterfreier Test der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient berechnet und geprüft.

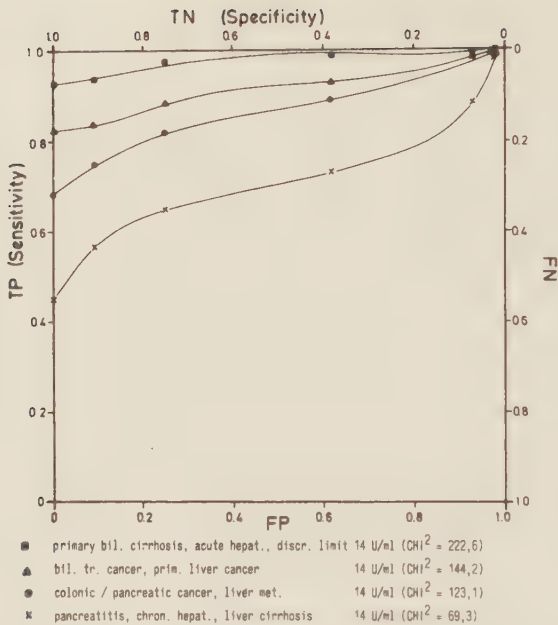
Die Ergebnisse der Korrelationsberechnungen und Signifikanzprüfungen sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Aus der Tabelle geht hervor, daß Alpha-Fetoprotein und Bilirubin für keine der untersuchten Patientengruppen mit dem BGP-Spiegel korrelierte. Ferner bestand bei der überwiegenden Zahl der Gruppen keine Korrelation zwischen BGP und CEA bis auf die Gruppen Colon-Karzinom und Pankreas-Karzinom, bei denen eine sehr starke

($r_s=0,594$, $p < 0,005$) bzw. gerade signifikante Korrelation ($r_s=0,342$, $p < 0,05$) zu verzeichnen war. Diese Korrelationen erklären sich aus dem Umstand, daß in diesen beiden Gruppen häufig pathologische und z.T. hohe CEA-Konzentrationen vorlagen. Auch für die alkalische Phosphatase bestand für die meisten Gruppen keine Korrelation zum BGP-Spiegel; sie war nur für das primäre Leberzellkarzinom ($r_s=0,508$; $p < 0,01$) und für das Pankreas-Karzinom ($r_s=0,699$; $p < 0,01$) zu sichern. Am deutlichsten konnte bei 4 der 9 Krankheitsgruppen eine starke Korrelation zwischen BGP und der γ -Gt gefunden werden, und zwar für die Leberzirrhose ($r_s=0,646$; $p < 0,001$), das primäre Leberzellkarzinom ($r_s=0,566$; $p < 0,005$), das Colonkarzinom ($r_s=0,734$, $p < 0,02$) und das Pankreas-karzinom ($r_s=0,733$; $p < 0,001$).

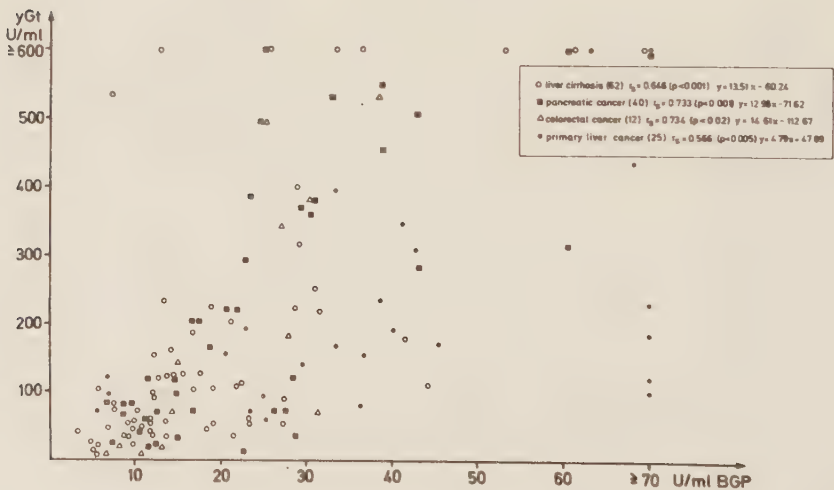
Aufgrund dieser Untersuchungen kann gefolgert werden, daß der BGP-Spiegel am ehesten mit der γ -Gt-Aktivität korreliert ist. Für einen Teil der nicht-signifikanten Korrelationsbefunde der anderen Diagnosegruppen und auch bei der alkalischen Phosphatase sind u.a. auch zu kleine Fallzahlen verantwortlich. In Abbildung 34 sind die BGP- und γ -Gt-Werte der vier signifikanten Diagnosegruppen in einem Diagramm eingetragen; eine angedeutete Punktwolke mit Betonung der Diagonalen wird ersichtlich. In Abbildung 35 sind im Vergleich dazu fünf Diagnosegruppen mit ihren CEA- und BGP-Spiegeln gegenübergestellt; trotz einer Korrelation von zwei Diagnosegruppen (Pankreas-, Colonkarzinom)- wie oben besprochen - zeigte sich deutlich, daß der überwiegende Teil der BGP- und CEA-Werte nicht miteinander korreliert ist. Insbesondere ist wichtig festzustellen, daß sowohl etliche Fälle mit sehr hohen BGP- und normalen bzw. nur gering erhöhten CEA-Werten auftreten als auch viele Fälle mit normalen BGP- und z.T. stark erhöhten CEA-Spiegeln. Dieser Befund macht noch einmal deutlich, daß der hier verwandte BGP-RIA nicht von CEA beeinflußt wird.

	<u>Y - GT</u>	<u>AP</u>	<u>BILIRUBIN</u>	<u>CEA</u>	<u>AFP</u>
LEDERZIRRHOSE	N = 62 rs=0,646 p<<0,001	NS	NS	NS	NS
PRIMÄR BILIÄRE ZIRRHOSE	NS	NS	NS	NS	NS
LEDERMETASTASEN	NS	NS	NS	NS	NS
PRIMÄRES LEBERCARCINOM	N = 25 rs=0,566 p<0,005	N = 27 rs=0,508 p<0,01	NS	NS	NS
COLON-CARCINOM	N = 12 rs=0,7343 p<0,02	NS	NS	N = 25 rs=0,594 p<0,005	NS
PANKREAS- CARCINOM	N = 40 rs=0,733 p<0,001	N = 17 rs=0,699 p<0,01	NS	N = 47 rs=0,342 p<0,05	NS
GALLENWEGS- CARCINOM	NS	NS	NS	NS	NS
AKUTE/CHRON. HEPATITIS	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS
PANKREATITIS	NS	NS	NS	NS	NS

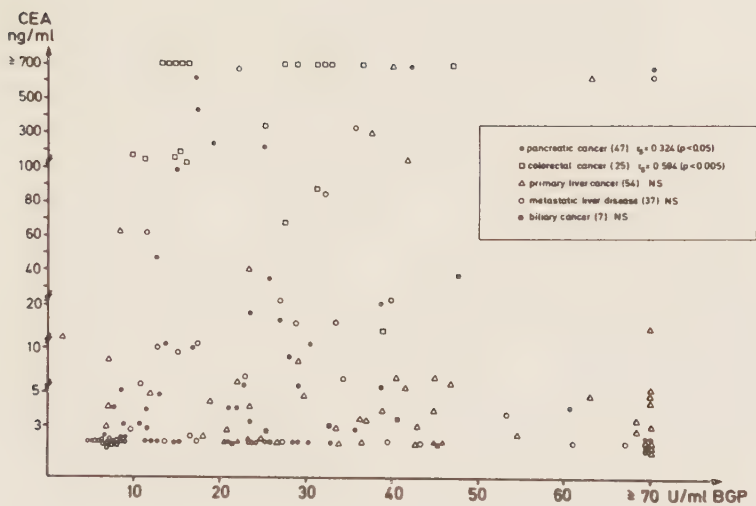
T A B E L L E 17 : Korrelationsberechnungen und Signifikanzprüfungen von BGP mit anderen gemessenen Parametern



AB B I L D U N G 33 : ROC-Kurven von BGP-Serum-Spiegeln



AB B I L D U N G 34 : Korrelation zwischen BGP-Serum-Spiegeln und y-Gt bei unterschiedl. Erkrankungen



A B B I L D U N G 35 : Korrelation zwischen BGP- und CEA-Serum-Spiegeln bei unterschiedl. Erkrankungen

6.1 Methodischer Teil

6.1.1 Extraktion und Reinigung des Antigens

Ebenso wie SVENBERG und seine Mitarbeiter (74,75) extrahierten auch wir das biliäre Glykoprotein BGP I aus Lebergalle. Da uns jedoch die von derselben Arbeitsgruppe beschriebene Poolung von perioperativ abpunktierte Gallenblasenflüssigkeit in Anbetracht der benötigten Gesamtmenge (60l!) zu aufwendig und langwierig schien, sammelten wir unser Ausgangsmaterial fast ausschließlich aus postoperativ angelegten T-Drainagen sowie in Einzelfällen aus PTC-Kathetern.

Die sog. "weiße Galle", die SVENBERG für die Extraktion von BGP II und BGP III verwandte, wurde bei uns nicht zur Isolierung eingesetzt. Erstens war bereits bekannt, daß es sich bei den isolierten Antigenen um NCA und CEA handelt und zweitens konnte in keinem Fall "weiße Galle" erhalten werden, vermutlich weil die Patienten schon vorher zur Operation kamen.

Vor der Lagerung bei -20°C versetzten wir die Galle mit 200 mg Natriumazid pro Liter Flüssigkeit, da Galle als idealer Nährboden für Bakterien gilt und wir eine bakterielle Kontamination vermeiden wollten.

SVENBERG begann die Extraktion mit einer 48-stündigen Dialyse gegen Leitungswasser sowie einer Zentrifugation bei 13000g zur Entfernung der Lipide und schloß erst danach die Perchlorsäurefällung an.

Nach der Methode von KRUPPEY et al. (42) versetzten wir die portionsweise aufgetaute Galle (2-3 l) sofort mit 1,2 M Perchlorsäure, da die Fällung der meisten anderen Proteine einen großen Trennungsvorteil bietet; die ersten Testungen zeigten,

daß es sich bei BGP um ein ähnlich robustes Glykoprotein wie CEA handelt und daß diese Art der Extraktion keine spürbaren Antigenverluste mit sich bringt. Da in Anbetracht der großen Flüssigkeitsmenge eine anschließende Ultrazentrifugation zur Entfernung der Lipide nicht möglich war, versuchten wir zunächst den eingeeengten Extrakt mit Hilfe eines Kohlefilters von Fett und Gallepigment zu trennen. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß durch diese Methode sehr viel Antigen verloren ging, weswegen auf diesen Reinigungsschritt verzichtet werden mußte.

Zur Reinigung des Antigens wurde der Galleextrakt ebenso wie bei SVENBERG et al. chromatographisch mittels einer DEAE-Sephacel-Anionenaustauschersäule aufgetrennt (Elution mit 0,13 M Phosphatpuffer, pH 7,5). Da die in dem Extrakt enthaltenen Fette und Farbstoffe das Gel im oberen Bereich der Säule erheblich einfärbten und auf ca. 2 cm irreversibel blockierten, mußte diese Schicht nach jeder Benutzung der Säule abgetragen werden, wobei der Rest der Säule nach Regeneration wieder brauchbar blieb. Um einen Antigenverlust zu vermeiden, wurden der erste und der zweite Elutionspeak gepoolt und gemeinsam affinitätschromatographisch weiterverarbeitet. Ebenso wie SVENBERG wählten wir dazu ConA-Sephadex; eluiert wurde das an die Matrix gebundene biliäre Glykoprotein BGP I mit Startpuffer (0,1 M Na-Acetatpuffer pH 6,3 + 1M NaCl + 1mM MnCl₂ + 1mM MgCl₂ + 1mM CaCl₂ + 0,02% NaN₃) und 5% 1-O-Methyl-Alpha-D-Glucopyranosid, wodurch gebundenes Glykoprotein aus einer alpha₂D-Glykosylpyranosid-Bindung kompetitiv verdrängt wurde. Nach der OUCHTERLONY-Testung zeigte sich, daß nur der 2. Peak (CON A/3) mit Anti-BGP-Serum reagierte und somit für die weitere Isolierung von BGP geeignet war. Anders als SVENBERG, der im Anschluß an die Affinitätschromatographie mit Gelfiltration auf Sephacryl S-200 und Sephadex G-200 weiterisolierte, wurde in vorliegender Arbeit mit Hilfe der Immunsorptions-Chromatographie (CnBr-aktivierte Sepharose 4B) das biliäre Glykoprotein von kreuzreagierenden Antigenen ge-

reinigt. Zu Beginn der Arbeit stand uns lediglich eine Anti-NCA-Säule (die mit NCA kreuzreagierende Antikörper aus polyvalenten Anti-CEA-Seren enthielt) zur Verfügung; nachdem jedoch ein spezifisches Antiserum hergestellt worden war, isolierten wir das Antigen mit Hilfe einer Anti-BGP-Säule (Elutionspuffer: 0,02 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,3 + 0,9%NaCl, + 2 M KSCN).

Um noch bestehende Proteinverunreinigungen zu beseitigen, hat sich zur schonenden Isolierung von BGP die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) angeboten. Die ionisch geladenen Proteinmoleküle wurden zunächst an die Matrix einer TSK 545 DEAE Ultropac - Säule gebunden und mittels eines Gradientenmischers durch kontinuierlichen Zusatz von Kochsalz (von 0,05 M bis 0,5 M Na-Phosphatpuffer) sequenziell eluiert. Wir erhielten 2 BGP-haltige Peaks, von denen der zweite Peak mit Serumproteinen verunreinigt war. Daraufhin wurde Fraktion I der HPLC-Anionenaustauschersäule zur Überprüfung der Reinheit auf einer HPLC-Gelfiltrationssäule (TSK-G 4000 SWG) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Eluiert wurde mit 0,05 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5.

Nach all diesen Reinigungsschritten zeigte die BGP-Präparation in der Doppeldiffusion keine Reaktion mehr mit Antiserum gegen Humanserum, Albumin, Alpha₁-Glykoprotein, Alpha₁-Chymotrypsin und Alpha₁-Antitrypsin, jedoch eine deutliche Präzipitationslinie mit Anti-BGP-Serum und auch mit nicht spezifischem Anti-CEA-Serum.

Ein Vergleich der Effizienz beider Trennfolgen ist nicht möglich, da SVENBERG et al. in ihrer Arbeit keine diesbezüglichen Angaben machen und da in der vorliegenden Arbeit der Radioimmunoassay erst am Schluß der wissenschaftlichen Arbeit für die Bestimmung zur Verfügung stand und retrograd keine Präparationen mehr vorhanden waren. Dennoch zeigt ein Vergleich der beiden Methoden, daß wir mit Hilfe der Immunitätssäule sehr früh zu einer spezifischeren Isolierung von BGP gekommen sind und daß die weitere Isolierung mit Hilfe

der hochauflösenden Anionenaustauscher- und Gelpermeationschromatographie eine wesentliche Bereicherung in der Trennmethode darstellt.

Das hochgereinigte Antigen wurde von SVENBERG als ein Molekül mit α_1 -Mobilität (74) charakterisiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration markierte SVENBERG (75) BGP I mit 125 Natriumjodid und fand ein Molekulargewicht von 62000 bis 110000 D. Der größte radioaktive Peak lag allerdings bei 83000 $\pm$ 4000 D, so daß SVENBERG dies als eigentliches Molekulargewicht für das biliäre Glykoprotein annahm. Im Vergleich dazu fanden wir ein Molekulargewicht von 107000 D. Zur Erklärung dieses Unterschieds ist zu sagen, daß wir die Bestimmung mit der hochauflösenden Gelpermeationschromatographie durchführten, wobei nicht bekannt ist, inwieweit unsere Elektrophorese-Markerproteine durch diese Art der Säulenchromatographie verändert wurden und somit auch auf das Molekulargewicht von BGP I falsche Rückschlüsse erlaubten. Zum anderen ist es denkbar, daß bei der Methode von SVENBERG et al. BGP und die Markerproteine durch die Radioaktivität in ihrer Struktur verändert wurden und dadurch zu niedriges apparentes Molekulargewicht vortäuschten.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte SVENBERG (76) BGP in den Canaliculi, den größeren Gallengängen und auf der Oberfläche der Gallenblasenmukosa lokalisieren. Diese Untersuchungen stimmen völlig mit unseren Ergebnissen überein.

Der beste Hinweis für die Identität unseres Antigens mit dem der Arbeitsgruppe von HAMMARSTRÖM und SVENBERG ist jedoch ein inzwischen erfolgter Vergleich von Antigen und Antiserum (Antiserum Nr. 891 und 894 *), der eine immunologische Übereinstimmung zwischen Antigen- und Antiserum-Präparation im Radioimmunoassay ergab.

* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. HAMMARSTRÖM, Inst. f. Immunologie, Universität Stockholm Schweden

6.1.2 Herstellung der Antiseren

Als Antikörperbildner wurden sowohl von SVENBERG et al. als auch von uns Kaninchen verwendet. Für die Immunisierung wurde die hochgereinigte Fraktion I der HPLC-Molekulargewichtssäule benutzt. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von SVENBERG, die eine dreimalige intramuskuläre Immunisierung wählte, wurden unsere Kaninchen nach dem Schema von HIJMANS (29) immunisiert (siehe S. 35), das erfahrungsgemäß in einer relativ kurzen Immunisierungszeit von 8 Wochen hochtitrige Antiseren liefert. Zwar soll diese Art der Immunisierung wegen einer möglichen anaphylaktoiden Reaktion auf die intravenöse Verabreichung des Antigens mit einem höheren Risiko behaftet sein, doch in der vorliegenden Arbeit wurde die jeweils gegebene Antigenkonzentration so niedrig gewählt, daß ein solcher Zwischenfall nie beobachtet wurde.

Obwohl die zuletzt zur Immunisierung benutzte BGP-Präparation hochgereinigt war, zeigte das dagegen hergestellte Anti-BGP-Serum in der Doppeldiffusion eine deutliche Kreuzreaktion mit Lungenextrakt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das BGP-Molekül neben spezifischen auch unspezifische Antigen determinanten enthält, die auch auf NCA (nonspecific crossreacting antigen), einem in normalen Lungen- und Milz-Gewebe enthaltenen Protein, vorkommen.

Zunächst wurde das erhaltene Antiserum vorsichtshalber (trotz fehlender Reaktion in der Doppeldiffusion) gegen Normalserum und mit gewaschenen AB-Erythrozyten absorbiert, um unspezifische Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die antikörperhaltige IgG-Fraktion mit Hilfe einer Protein A-haltigen Sepharosesäule isoliert. Eluiert wurde mit dem Startpuffer (0,02 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,3 + 0,15 M NaCl + 0,02% NaN_3) unter Zusatz von 0,58% Eisessig. Um Kreuzreaktionen mit NCA und CEA zu beseitigen, wurden in der vorliegenden Arbeit Immunsorptionsssäulen zunächst mit angekoppeltem CEA, dann mit NCA eingesetzt. Da das Antiserum am Ende dieser Absorptionsreihe noch schwach mit Lungenextrakt reagierte, wurde es nochmals an

der NCA-Immunadsorptionssäule gereinigt. Schließlich zeigte das spezifische Anti-BGP-IgG keinerlei Reaktion mehr mit den zur Absorption verwandten Substanzen und war somit als immunologisch reines monospezifisches Antiserum zu verwenden, das im RIA vergleichbares Bindungsverhalten mit 2 polyklonalen Referenz-Anti-BGP-Seren von Kaninchen aufwies (LAMERZ, persönliche Mitteilung).

6.1.3 Radioimmunoassay

6.1.3.1 Markierung

Ebenso wie SVENBERG wählten auch wir die Chloramin T-Methode nach HUNTER (32) für die Markierung von BGP. Pro μg BGP I wurden etwa 15 uCI Radioaktivität (^{125}J) zugegeben (SVENBERG : pro μg BGP I etwa 40 uCI Radioaktivität / 75,77). Die Chloramin T-Methode ist eine einfach zu handhabende Markierungsmethode, die jedoch als wesentlichen Nachteil die Schädigung des zu markierenden Proteins durch das Oxidationsmittel Chloramin T oder das Reduktionsmittel Na-Di-Sulfit zusätzlich zur radioaktiven Beeinflussung besitzt. Um das zu markierende BGP I so gering wie möglich zu schädigen und damit eine Beeinträchtigung der Immunoreaktivität zu vermindern, wurden möglichst kleine Mengen an Chloramin T und Radioaktivität wie bei der laboreigenen CEA- und AFP-Markierung eingesetzt.

Zur Trennung der markierten Proteinfraktion von freiem Jod benutzten wir zunächst eine Sephadex G 50 fine-Säule (Elutionspuffer: 0,07M Veronalpuffer, pH 8,6). Die in dem ersten Peak enthaltenen markierten Proteine mit der höchsten Aktivität wurden auf einer Sephadex G 200-Säule rechromatographiert und mit dem o.g. Elutionspuffer eluiert. Die aufgrund einer radioimmunolo-

gischen Vortestung geeigneten immunoreaktiven Tracerfraktionen wurden gepoolt, mit RIA-Verdünnungspuffer verdünnt (20000 cpm/100 μ l) und in 10 ml-Portionen eingefroren.

Ein Vergleich mit den von SVENBERG erhaltenen Werten ist nicht möglich, da die Autoren keine entsprechenden Angaben in ihren Arbeiten machen.

6.1.3.2 Antikörperverdünnungskurve

Bei der vorliegenden Arbeit lag die 50%-Bindung für Antiserum Nr.47 bei einer Antikörperverdünnung von 1 : 3200, bei Antiserum Nr.47 hingegen bei 1:6400. Beide Kurven zeigten einen parallelen Verlauf mit dem steilsten Anstieg im Verdünnungsbereich zwischen 1:1600 und 1:25000, wobei Antiserum Nr. 45 offensichtlich stärker konzentriert war als Nr.47. Die relativ niedrigen Verdünnungen der beiden Antikörper-Präparationen erklären sich aus den wiederholten Reinigungs- und Absorptionsschritten mit entsprechenden Aktivitätsverlusten zugunsten einer größeren Spezifität.

Die Nachtestung mit dem Antiserum der Arbeitsgruppe von SVENBERG ergab vergleichbare Titer in der Bindung mit unserem Tracer (LAMERZ, persönliche Mitteilung).

6.1.3.3 Standardinhibitionskurve und Testansatz

Bei dem vorliegenden BGP-Test handelt es sich um einen direkten Test, d.h. die Bestimmung wird mit nativen Patientenserum oder sonstigen Proben durchgeführt.

Als Standard diente eine vorgereinigte BGP-Präparation, als 1. Antikörper ein eigenes Anti-BGP-Serum in geeigneter Verdünnung (Nr.45: 1:6400; Nr.47: 1:3200).

Einen der wichtigsten Parameter bei dem vorliegenden BGP-Radioimmunoassay stellt die Menge des pro Teströhrchen eingesetzten markierten Proteins dar. Sie bestimmt wesentlich die Empfindlichkeit des Systems und sollte daher so gering wie möglich sein. Andererseits muß die Radioaktivität hoch genug sein, um durch ausreichende Unterschiede in den Count-Zahlen eine exakte Messung zu ermöglichen, aber nicht so hoch, daß das Protein geschädigt wird. In Anbetracht dieser Überlegungen wurde in Anlehnung an andere laboreigene RIAS eine Aktivität von etwa 20000 cpm/Röhrchen eingesetzt. Darunter lag die Empfindlichkeit des Testsystems bei ca. 1U/ml, während die Verwendbarkeit des eingefrorenen portionierten Tracers mindestens 2 Monate betrug.

6.2 Klinischer Teil

6.2.1 BGP-Spiegel bei unterschiedlichen Kollektiven

6.2.1.1 BGP-Spiegel bei Normalpersonen

Da bei den 123 untersuchten Normalpersonen die BGP-Serum-Spiegel unter 14 U/ml lagen, in den meisten Fällen sogar deutlich darunter (Mittelwert 8,8 U/ml), wählten wir diesen Wert als obere Normgrenze. Aussagen über Geschlechts- und Altersverteilung konnten in der vorliegenden Arbeit nur bedingt erfolgen, da unser Normalkollektiv nicht entsprechend zusammengesetzt war. Soweit man jedoch von den vorliegenden Ergebnissen ausgehen kann, scheint keine Geschlechtsabhängigkeit und auch keine wesentliche Altersabhängigkeit für die BGP-Serum-Werte zu bestehen.

6.2.1.2 BGP-Spiegel bei benignen Erkrankungen

Keiner der Patienten mit dem Krankheitsbild Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zeigte einen erhöhten BGP-Serumspiegel. Auch bei Pankreatitiden und chronischen Hepatitiden war nur in einem geringen Prozentsatz der Fälle eine BGP-Erhöhung zu verzeichnen, und auch dann nur in einem unerheblichen Ausmaß von 10 - 30% (siehe Abb.29). Anders bei den Patienten mit der Diagnose Leberzirrhose, bei denen sich immerhin in etwa 50% der Fälle eine zum Teil deutliche BGP-Erhöhung zeigte. Beim Vergleich der Einzelfälle anhand von Tabelle 7 fällt auf, daß besonders bei Leberzirrhosen mit einer starken γ -Gt- und aP-Aktivität, also einer deutlichen cholestatischen Komponente, auch der BGP-Serumspiegel hohe Werte zeigte. Noch offensichtlicher wird dieser Zusammenhang bei den Patienten mit primär

biliärer Zirrhose, die ausnahmslos hohe BGP- sowie γ -Gt- und aP-Spiegel aufwiesen. Da bei diesen Patienten die Erkrankung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium war, hatte offensichtlich die zunächst bestehende destruierende Cholangitis bereits zu einer Obstruktion der Gallengänge geführt, so daß zum Zeitpunkt der Blutentnahme die cholestatische Komponente mehr zum Tragen kam als die entzündliche. Im Gegensatz dazu war bei dem großen Patientenkollektiv (N=117) mit akuter Hepatitis der größte Anstieg der BGP-Werte unter den benignen Erkrankungen zu verzeichnen, die γ -Gt und die aP-Aktivitäten waren jedoch nur sehr geringfügig bzw. gar nicht erhöht. Diese Tatsache macht deutlich, daß erhöhte BGP-Serumspiegel nicht nur bei cholestatischen sondern auch bei inflammatorischen Prozessen der Leber mit Zellzerfall beobachtet werden können.

6.2.1.3 BGP-Spiegel bei malignen Erkrankungen

Bei allen "Karzinom"-Kollektiven wurde in über 50% der Fälle eine zum Teil starke Erhöhung der BGP-Werte beobachtet; am deutlichsten war dies bei Patienten mit Gallenwegskarzinomen und primären Leberzellkarzinomen zu sehen, aber auch bei Lebermetastasierung waren in 70% der Fälle die BGP-Serumspiegel angestiegen. Auch bei Kolonkarzinomen waren großteils die BGP-Werte erhöht; allerdings war bei diesen Patienten in den meisten Fällen eine zusätzliche Lebermetastasierung vorhanden, so daß die Frage offen bleibt, ob der hohe BGP-Spiegel durch sekundäre Cholestase, ausgelöst durch die Lebermetastasen, zustande kam oder aber ob BGP direkt vom Tumor sezerniert bzw. vermehrt gebildet wurde.

6.2.1.4 BGP-Spiegel in der Galle

Da es sich bei den Galle-Pankreas-Sekreten um mit Pankreassaft verdünnte Proben handelt, erklärt sich die Diskrepanz zwischen den BGP-Werten in der "Normalgalle" und in Galle 1 bzw. 2. Den Ergebnissen zufolge liegt BGP in der Galleflüssigkeit in 10fach höherer Konzentration als im Serum vor, so daß ein biliärer Ausscheidungsmechanismus vermutet werden muß.

6.2.2 BGP als Cholestaseparameter

Die γ -Glutamyl-transpeptidase (γ -Gt) gehört wie auch die alkalische Phosphatase (aP) zu den sog. "klassischen" Enzymen für die Diagnostik von obstruktiven Lebererkrankungen. Zwar ist ihre höchste Aktivität in der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli zu finden, sie gilt jedoch als integraler Bestandteil vieler Zellmembranen (53). Die im Serum gemessene Aktivität entstammt, wie man inzwischen weiß, hauptsächlich der Leber, wo sie als membrangebundenes Zellenzym in den Epithelzellen der Gallengänge und periportal Gefäße sowie in den Kupffer'schen Sternzellen lokalisiert ist. Der Referenzbereich der γ -Gt liegt bei Frauen zwischen 4 und 18 U/l, bei Männern zwischen 6 und 28 U/l (79). Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, daß die Synthese der γ -Gt in der Leber durch mehrere Xenobiotika, darunter auch Medikamente wie Warfarin, Barbiturate, Östrogene und insbesondere Antiepileptika, induziert werden kann (69). Auch Alkohol bewirkt bekanntlich zum Teil deutlich erhöhte γ -Gt-Spiegel im Serum, wobei der genaue Mechanismus für diese Erhöhung bis heute nicht endgültig geklärt ist (56). Die Tatsache, daß in diesen Fällen von allen Laborparametern isoliert nur die γ -Gt

pathologische Werte zeigt, spricht wohl doch mehr für eine Enzyminduktion als für einen Leberzellschaden (73). Ob die erhöhte γ -Gt-Aktivität im Serum ein Befund mit Krankheitswert ist, muß deshalb in erster Linie von dem Ausmaß der Erhöhung sowie von anderen laborchemischen und klinischen Befunden abhängig gemacht werden. Durch medikamentös bedingte Induktion wird die Aktivität meist nur auf weniger als das Doppelte, nur ausnahmsweise bis zum Fünffachen erhöht. Dadurch, daß das Konzentrationsgefälle zum Extrazellulärraum steigt und die γ -Gt sich von den canaliculären auf die lateralen Anteile der Leberzellmembranen ausbreitet, kann die γ -Gt Aktivität im Serum "physiologischerweise" zunehmen (73). Sinkt nun der Gewebe-Plasma-Quotient ab, indem das Dreifache der individuellen Norm überschritten wird, so kommt zur vermehrten Synthese durch Enzyminduktion ein weiterer Faktor hinzu, der über eine Membranstörung zur Labilisierung der γ -Gt führt. Bei cholestatischen Lebererkrankungen sind dies die retinierten Gallensäuren, die die γ -Gt von der Zelloberfläche ins Plasma abspülen und so zu erhöhten Aktivitäten im Serum führen. Besonderes Interesse gilt der γ -Gt hinsichtlich ihrer Rolle als Marker sekundärer Leberbeteiligungen von Primärtumoren anderer Lokalisation (90). Nach neuesten Untersuchungen beträgt ihre Sensitivität bei Lebermetastasen immerhin 75%, die Spezifität liegt bei 80%.* Ob diese frühe Reaktion bei Tumoren in diesem Bereich durch ihre Fähigkeit bedingt ist, die Assimilation von Aminosäuren zu kontrollieren, oder aber ob ihre Sensitivität so hoch ist, daß sie bereits auf geringfügige Alterationen im Bereich des den Tumor umgebenden Gewebes reagiert, ist noch ungeklärt.

Neben der γ -Gt bestimmten wir als zweiten diagnostischen Parameter bei cholestatischen Erkrankungen in den meisten Patientenserum die alkalische Phosphatase (aP). Die aP ist als Enzym in vielen verschiedenen Körperzellen lokalisiert und liegt dort entweder im Zytoplasma gelöst oder an Membranstrukturen gebunden vor. Die höchste aP-Aktivität findet sich

ebenso wie bei der γ -Gt in der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli, im Skelettsystem, im Leberparenchym und in den Gallenwegsepithelien. Die Serumaktivität der aP gesunder Personen (Normwert für Frauen bis 50 J.: 55-147, über 50 J.: 55-170 U/l; für Männer 70-175 U/l /94) repräsentiert den normalen Umsatz zellständiger Enzyme. Die alkalische Phosphatase kommt im Serum in Form mehrerer Isoenzyme vor, wovon die Hauptfraktion die Leberzell-aP darstellt, gefolgt von der Knochen- und Dünndarm-aP. Um pathologische Isoenzyme handelt es sich bei der Gallengangs-aP und der β -Lipoprotein-gebundenen aP, die beide bei Cholestase vermehrt nachweisbar sind (18). Die Gallenwege sind der natürliche Ausscheidungsweg der Leberzell- sowie der Gallengangs-aP, was die Aktivitätserhöhung der Gesamt-aP im Serum bei intra- oder extrahepatischer Cholestase erklärt. Wenn pathologische Knochenprozesse (wie Metastasen oder Osteoporose) ausgeschlossen werden können, gilt die aP in Kombination mit der γ -Gt als guter diagnostischer Parameter bei cholestatischen Erkrankungen.

Bekanntlich bewirkt eine Cholestase auch Veränderungen der Lipoproteinfraktionen im Sinne einer Zunahme der low density Lipoproteine auf Kosten der HDL-Fraktion. Die low density Lipoproteinfraktion von Patienten mit cholestatischen Erkrankungen enthält ein besonderes, im Blut Gesunder nicht nachweisbares Lipoprotein, das als LP-X bezeichnet wird (51,80). LP-X ist ein in der Agarosegelelektrophorese in β -Position wanderndes Lipoprotein mit extrem niedrigen Proteinanteil und hohem Anteil an Phospholipiden und Cholesterinestern. Der positive LP-X-Befund erlaubt zwar nicht die Differenzierung zwischen intra- und extrahepatischem Verschuß, gilt aber für die Cholestase allgemein als spezifischer und empfindlicher Parameter. Bei akuter Hepatitis gilt das Verschwinden von LP-X als sicherer Indikator für den Heilungsprozess (52). Obwohl LP-X eine elektrophoretische β -Mobilität hat (BGP dagegen α_1 -Mobilität), wurde zum Ausschluß eines eventuellen LP-X-Gehalts unserer Antigenpräparation der BGP-Tracer gegen ein

LP-X-Antiserum getestet. Es zeigte sich jedoch keinerlei Bindung.

Neben der γ -Gt, der aP und eventuell auch dem Lipoprotein X gibt es noch einen weiteren für die Cholestase spezifischen Parameter. Es handelt sich um die Leucin-Arylamidase (LAP), die zwar ebenso wie die γ -Gt in vielen Organen vorkommt, deren größte Aktivität jedoch in den Gallengangsepithelien lokalisiert ist. Cholestase bewirkt sowohl den Übertritt der LAP ins Plasma als auch eine verstärkte Neubildung dieses Enzyms (93). In der vorliegenden Arbeit war es uns nicht möglich den BGP-Tracer auf eine mögliche Bindung mit der LAP zu untersuchen, da wegen der enzymatischen Bestimmungsmethode kein Antiserum zur Verfügung stand.

Wie auch die Erstbeschreiber des BGP SVENBERG et al.(78) fanden auch wir für einige Patientenkollektive eine signifikante Korrelation zwischen γ -Gt und BGP. Es liegt die Schlußfolgerung nahe, daß das biliäre Glykoprotein durch die gleichen pathologischen Mechanismen wie die γ -Gt vermehrt im Serum erscheint. Zwar zeigt die γ -Gt bei pathologischen Prozessen wesentlich höhere Aktivitäten im Serum, doch in Anbetracht der vorhin erwähnten unspezifischen γ -Gt-Erhöhungen durch medikamentösen oder alkoholischen Einfluß läßt die Spezifität zu wünschen übrig. Bei Betrachtung der Tabellen mit den unterschiedlichen Patientenkollektiven und verschiedenen labordiagnostischen Parametern fällt auf, daß es Fälle gibt, in denen die γ -Gt normale Werte zeigt, während BGP erhöht ist, oder aber umgekehrt. Diese Beobachtung läßt die Frage aufkommen, ob es nicht doch Situationen gibt, in denen BGP sensibler reagiert als die γ -Gt und somit gut als diagnostischer Parameter bei cholestatischen Erkrankungen geeignet wäre.

Unter Berücksichtigung der klinischen Daten von BGP fallen 2 weitere Proteine auf, die sich bei Cholestase und auch besonders bei akuten Hepatitiden ähnlich verhalten wie das biliäre Glykoprotein, nämlich das sekretorische IgA und Procol-

lagen III-Peptid.

IgA ist die vorherrschende Immunglobulinklasse, die in externen Sekreten des Verdauungs- und des Bronchialtraktes sowie auch der Brustdrüsen gefunden wird. Während IgA im Serum in erster Linie in monomerer Form vorliegt, erscheint es in den verschiedenen Körperflüssigkeiten meist als polymeres Protein, gebunden an ein Verbindungsstück (J-Kette), das von den Plasmazellen gebildet wird und an eine sog. sekretorische Komponente (SC), die auf der Oberfläche der intestinalen Epithelzellen lokalisiert ist und mit dem Immunglobulin A Komplexe bildet (3). Diese Komplexe werden mittels Endozytose in das Zytoplasma eingeschleust, mit Hilfe von Vesikeln durch die Zelle transportiert und in das Lumen der jeweiligen Körperhöhlen abgegeben (12). Wie seit langer Zeit bekannt ist, haben Patienten mit Hepatopathien zum Teil deutlich erhöhte IgA-Serum-Spiegel (48). Auffällig an dieser Erhöhung ist besonders die Tatsache, daß die polymere Form des IgA auf Kosten der monomeren zunimmt (Anstieg des polymeren IgA von 8% auf 45%!/ 45). Wie außerdem etliche Untersuchungen zeigen, korreliert die sekretorische Komponente SC stark mit anderen Cholestasemarkern (19), wobei jedoch auch in diesem Fall wie bei γ -Gt, aP, LP-X und LAP nicht zwischen intra- und extrahepatischer Cholestase unterschieden werden kann. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß SC im Gegensatz zu BGP nur in den größeren Gallengängen, nicht aber in den Canaliculi gefunden wird (9). Ob der erhöhte IgA-Serumwert bei Erkrankungen der Leber auf eine vermehrte Synthese des polymeren IgA oder aber auf einen verminderten Abtransport in den Galletrakt zurückzuführen ist, ist bis heute nicht geklärt. Auch über den Transportmechanismus des Serum-IgA in die Galle existieren unterschiedliche Thesen: NAGURA et al. (54) zeigten in immunhistochemischen Untersuchungen, daß IgA mit Hilfe der sekretorischen Komponente SC durch die Epithelzellen entlang der Gallengänge geschleust wird. DELACROIX und Mitarbeiter (13) favorisieren sowohl den selektiven Transport von IgA durch die Hepatozyten als auch durch die Zellen der Gallengänge.

Bei der Testung unseres BGP-Tracers gegen ein SC-Antiserum ergab sich trotz der vielen klinischen Parallelen keine Bindung mit der sekretorischen Komponente SC.

Prokollagen III ist eine Vorstufe des an der extrazellulären Matrix von Bindegewebe deponierten Kollagens. Zunächst wird Prokollagen III von der Zelle synthetisiert und in den Extrazellulärraum sezerniert; dort werden Propeptide abgespalten (Prokollagen III-Peptid), und die dabei entstandenen Kollagen-Monomere als Kollagenfibrillen im Bindegewebe abgelagert. Da das abgespaltene Prokollagen III-Peptid in den Blutkreislauf gelangt und somit im Serum nachgewiesen werden kann, stellt es einen guten Indikator für Bindegewebsvermehrungen (Fibrosierungen) dar. Anhand eines erhöhten Serum-Prokollagen III-Peptid-Spiegels ist somit der Umbau funktionsfähigen Lebergewebes zu Bindegewebe erkennbar (21). Der Normbereich für Prokollagen III liegt bei 3 - 15 ng/ml. Nach immunhistochemischen Untersuchungen von KONOMI et al.(41) sowie WICK et al.(95) läßt sich dieses Peptid in Leberschnitten besonders im Interstitium der Portalfelder und in den Perisinusoidalräumen nachweisen. Ebenso wie das sekretorische IgA wird das Prokollagen III-Peptid biliär ausgeschieden bzw. ein geringer Teil auch glomerulär filtriert (62). Bei Patienten mit Leberzirrhose wird zwar Prokollagen III vermehrt in die Galle ausgeschieden, jedoch nicht in proportionalem Umfang zur Erhöhung des Serumspiegels. Daraus läßt sich ersehen, daß der erhöhte Prokollagen III-Peptid-Wert im Serum bei Leberzirrhose, primär biliärer Zirrhose und auch akuter Hepatitis (68) nicht nur auf vermehrte Neubildung, sondern auch auf reduzierte Ausscheidung zurückzuführen ist.

Da das in der vorliegenden Arbeit isolierte biliäre Glykoprotein bezüglich der klinischen Daten große Ähnlichkeit mit Prokollagen III aufweist, wurde der BGP-Tracer gegen Anti-Prokollagen III getestet, es zeigte sich jedoch auch hier keine Bindung.

Da sich anscheinend bei den erwähnten Cholestaseparametern und bei Cholestase vermehrt auftretenden Glykoproteinen immer wieder die Frage nach der Herkunft bzw. dem Ausscheidungsmechanismus stellt, wäre es natürlich in diesem Zusammenhang interessant, auch in der vorliegenden Arbeit mehr über Herkunft, Lokalisation und insbesondere auch den Ausscheidungsmechanismus des biliären Glykoproteins BGP zu wissen. Da BGP nach den vorliegenden Untersuchungen im Normalserum mit einer Basiskonzentration bestimmt werden kann und in 10fach höherer Konzentration in der Galle vorkommt, darf seine vorwiegend biliäre Ausscheidung als gesichert gelten.

Galle ist zwar eine komplexe, mit Plasma isoosmotische Flüssigkeit, die in erster Linie aus Wasser, anorganischen Elektrolyten und organischen Bestandteilen wie Gallensäuren, Cholesterin, Phospholipiden und Bilirubin zusammengesetzt ist, die aber auch bis zu 5% der soliden Bestandteile an Proteinen enthält (30). Nur ein kleiner Teil der über die Hepatozyten ausgeschiedenen Substanzen wird auch dort produziert, das Gros der Bestandteile der Galle wird mit dem Blut zu den Leberzellen transportiert und kann dann mittels verschiedener Transportmechanismen in die Galle gelangen (20). Entweder auf dem transzellulären Weg durch die dem Disse'schen Raum anliegende sinusoidale Membran und Abgabe über die interzelluläre Membran der Canaliculi oder unter Umgehung der Hepatozyten auf dem interzellulären Weg unter Überwindung der Tight Junctions (47). Möglich ist auch eine Kombination des transzellulären und parazellulären Transportmechanismus.

Ähnlich wie bei der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate durch die Inulin-Clearance konnte die in die Gallenkapillaren sezernierte Galleflüssigkeit mit Hilfe von wasserlöslichen Substanzen wie Mannitol abgeschätzt werden. Durch diese Mannitol-Clearance konnte festgestellt werden, daß in 24 Stunden etwa 450 ml Galle die Canaliculi passieren, also fast drei Viertel der gesamten täglichen Galleproduktion (59,63). REUBEN et al. (65) teilten die in der Galle vorkommenden Proteine in 3 Gruppen

ein: Plasmaproteine, die auch in der Galle gefunden werden, Enzyme, die aus den Hepatozyten stammen und sog. "zur Galle gehörende Proteine", die nur in der Galle, nicht aber im Serum gefunden werden. Die dem Plasma entstammenden Proteine werden entweder wie z.B. Albumin mittels einfacher Diffusion durch eine semipermeable Membran wie die Tight Junctions oder wie z.B. IgA durch Endozytose mit Hilfe von Vesikeln in die Galle eingeschleust (47). Die meisten in der Galle vorkommenden Enzyme sind wie auch die aP und die LAP auf der zellständigen Membran der Canaliculi lokalisiert und werden durch die lösende Wirkung der Gallensäuren von der Oberfläche abgespült (24). Über diejenigen Proteine, die nicht im Serum sondern nur in der Galle gefunden werden, wie z.B. secretory component SC oder auch LP-X herrscht immer noch Unklarheit über die exakte Herkunft und auch die Aufgabe dieser Proteine (65).

Da auch das mit BGP kreuzreagierende carcinoembryonale Antigen CEA zu den Plasmaproteinen gehört, die in der Galle gefunden werden, sind die Untersuchungen von THOMAS und Mitarbeitern (24,83) über den Ausscheidungsmodus des carcinoembryonalen Antigens für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse.

Wie ja schon seit einigen Jahren bekannt ist, werden die Serum-CEA-Spiegel deutlich von der Leberfunktion beeinflusst. So werden z.B. bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose stets leicht erhöhte CEA-Serum-Werte gemessen, was häufig die Verlaufskontrolle von malignen Tumoren erschwert. THOMAS fand nun in seinen Arbeiten, daß CEA entweder von den Kupffer'schen Zellen aufgenommen und nach Entfernung der Sialinsäurereste wieder in den Sinusoidalraum abgegeben wird, oder aber- wenn bereits vorher keine Sialinsäurereste mehr vorhanden waren- direkt von den Hepatozyten mit Hilfe des Rezeptors HBP (hepatic binding protein) gebunden und in die Zelle eingeschleust wird. Als dritte Möglichkeit kann CEA auch unter Umgehung der Leberzellen durch Überwindung der Tight Junctions in die Galle

gelangen; dieser Weg spielt jedoch mengenmäßig nur eine kleine Rolle im Vergleich zu den transzellulären Ausscheidungsmechanismen (84).

Wie bereits vorhin erwähnt, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich für einen biliären Ausscheidungsweg des biliären Glykoproteins BGP. Dafür spricht auch sein färberischer Nachweis in den Canaliculi. Da jedoch bei den wiederholten Färbungen niemals in den Hepatozyten direkt BGP gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, daß BGP extrahepatisch gebildet werden könnte. Dafür sprechen auch Untersuchungen von REISCHLE (64) und WIEBECKE et al. (46), die vergleichend BGP, CEA und NCA immunhistologisch in verschiedenen Organen untersuchten.

Nach ihren Ergebnissen zeigte Anti-BGP-Serum im Gegensatz zu Anti-CEA- und Anti-NCA-Serum eine starke epitheliale Färbung der Gallenkapillaren (Canaliculi) im embryonalen Lebergewebe, nicht jedoch in der normalen adulten Leber, wo sie erst wieder während einer hepatischen (Leberzirrhose, prim.biliäre Zirrhose) oder extrahepatischen Gallenwegsobstruktion auftauchte. Zusätzlich war BGP in mehr differenzierten Tumorzellen beim primären Leberzellkarzinom und cholangiozellulären Karzinom sowie in normalen Leberzellen in der Umgebung von Lebermetastasen nachweisbar. Im Widerspruch zu den Befunden der Erstbeschreiber von BGP I konnte BGP demnach nicht in den Gallengängen oder der Gallenblase und auch nicht in den Canaliculi der normalen adulten Leber gefunden werden. Ein Grund für diese differenten Befunde könnte eine geringere Absorption der polyclonalen Antiseren der Erstuntersucher im Vergleich zu den in der immunhistologischen Arbeit durchgeführten mehrfachen ausführlichen Absorptionsstudien sein.

Als wesentlicher neuer Befund wurde von WIEBECKE und REISCHLE jedoch eine zusätzliche Anfärbung mit dem Anti-BGP-Serum auf der Oberfläche normaler adulter Kolonschleimhautzellen und bei Colitis ulcerosa mit strikter Begrenzung auf die Lumengren-

ze des Epithels im Gegensatz zu CEA und NCA mit mehr diffuser Verbreitung bis in die Krypten nachgewiesen. Ferner war es in Colon-Adenomen und sehr stark in mehr differenzierten colorectalen Karzinomen und in seinen Lebermetastasen exprimiert, zusätzlich noch als Oberflächen-Antigen in normalen fetalen und adulten sowie karzinomatös entarteten Endometriumzellen.

Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit erhobenen BGP-Serumbefunde und der referierten histologischen Befunde können folgende z.T. hypothetische Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Das Wiederauftreten von BGP in der Leber bei intra- wie extrahepatischer Gallenwegsobstruktion und seine dabei auftretende Konzentrationserhöhung im Serum läßt sich durch eine biliär-obstruktive Anreicherung eines im Serum zirkulierenden normalen Colon-Antigens erklären, das in der Leber geklärt und in der Galle ausgeschieden wird (BGP als Cholestase-Parameter).

2. Das Wiederauftreten von BGP bei Leberzirrhose, prim. biliärer Zirrhose und extrahepatischer Gallenwegsobstruktion kann auch als Zeichen einer Reexpression eines fetalen Antigens gedeutet werden (BGP als fetales Antigen).

3. Das immunhistologische Verteilungsmuster von BGP und sein Wiederauftreten in Tumorzellen einiger maligner Erkrankungen legen die Vermutung nahe, daß es sich bei BGP um ein onkofetales Differenzierungs-Antigen mit besonderer Expression in Colon, Leber und Endometrium handelt (BGP als onkofetales Antigen).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird ein Überblick über Vorkommen, physikochemische Eigenschaften und klinische Bedeutung des carcinoembryonalen Antigens (CEA) sowie über seine wesentlichen kreuzreagierenden Antigene (NCA-1, NCA-2, BGP I u.a.) gegeben.

Im zweiten Teil werden Verfahren zur Reinigung und Isolierung des biliären Glycoproteins (BGP I) und seiner radioimmunologischen Messung in Körperflüssigkeiten vorgestellt.

BGP I wurde mittels Perchlorsäure (PCA, 0,6 M) aus gepoolten Gallengangs-Drainage-Galleflüssigkeiten (60 L) von cholezystektomierten Patienten extrahiert, der Überstand des Extraktes wurde nach Zentrifugation (1000 g, 20'), Dialyse (Leitungswasser, 48 h, Phosphatpuffer) und Konzentrierung ultrafiltriert und portioniert. Die weitere Reinigung geschah durch eine Folge von Anionenaustauscherchromatographie (DEAE-Sephacel, Fr.I + II), Lectinaffinitätschromatographie (CON A-Sepharose, Fr.3) und Immunaaffinitätschromatographie (CNBr.-aktiv. Sepharose 4B mit angekoppelten kreuzreagierenden unspezifischen Anti-CEA-IgG bzw. Anti-BGP-IgG vom Kaninchen, Fr.3). Die abschließende Isolierung von BGP wurde erst durch hochauflösende HPLC-Anionenaustauscherchromatographie (TSK-G4000 SWG, Fr.1) erreicht. Diese BGP-Präparation zeigte elektrophoretische alpha-Mobilität und gelchromatographisch ein apparentes Molekulargewicht von 107000 Daltons. Sie wurde zur Immunisierung von 2 Kaninchen verwandt, deren Antiseren nach Vorabsorption (Normalserum, Erythrozyten) affinitätschromatographisch (Protein A-Seph. CL-4B, Fr.3) als Gesamt-IgG-Präparation gewonnen und durch sequentielle und repetitive Immunaaffinitätschromatographie-Absorption (CNBr.-aktiv. Seph.4B mit angekoppeltem NCA=Lungen-PCA-Extrakt bzw. CEA, jeweils Fr.1) BGP-spezifisch gemacht wurden.

Das spezifische Anti-BGP-IgG bzw. weiter absorbierte Fraktionen wiesen im Scatchard-Plot maximale Affinitätskonstanten von $K_a = 1,18 \times 10^{10}$ (Nr.45) bzw. $8,74 \times 10^9$ l/Mol auf und reagierten immunhistologisch u.a. spezifisch mit Gallenkapillaren (Canaliculi) vor allem in Lebern mit intra- oder extrahepatischer Gallenwegsobstruktion.

Mit den hochgereinigten BGP- und Anti-BGP-Präparationen wurde ein kompetitiver Doppelantikörper- ^{125}J -Radioimmunoassay entwickelt (Markierung nach Chloramin T-Methode, spez. Aktivität 18,2 uCi/ug; 1.Antikörper:Anti-BGP-IgG v. Kaninchen Nr.45/47, Verdünnung 1/2000-4000; 2.Antikörper: Anti-Kan.IgG-Serum v.d.Ziege, 1/20). Der Tracer ließ sich im Meßbereich (0,6 - 160 U/ml; 1U = 14 ng) nicht von 1000-fach größeren Mengen von CEA bzw. NCA verdrängen; ferner band er nicht mit Antisera gegen CEA, NCA, Prokollagen III, secretory component (IgA) und Lipoprotein X (Intra-Assay-Variation 5%, Inter-Assay-Variation 15%).

Mit dem etablierten und standardisierten Radioimmunoassay (Standard-Logit-Log-Geradengleichung $y = 1,79 - 2,10 x$) wurden BGP-Bestimmungen in normalen Gallen ($x = 188,1 \pm 73,1$ U/ml) und Serumproben von männlichen Normalpersonen ($x = 8,8 \pm 2,2$ U/ml, N=123) sowie Patienten mit verschiedenen benignen (N=299) und malignen Erkrankungen (N=193) durchgeführt, wobei das BGP-Konzentrationsverhältnis Normalgalle : Normalserum 21:1 betrug. Gegenüber einer Normgrenze von 14 U/ml fanden sich höchste Sensitivitätsraten pathologischer Spiegel (bis maximal 150 U/ml) beim primären Leberzellkarzinom (83%), Gallenwegskarzinom (77%), bei Lebermetastasen, Pankreas- und Colonkarzinom (68-70%), aber ebenso auch bei benignen Erkrankungen wie primär-biliärer Zirrhose (100%), akuter Hepatitis (92%), Leberzirrhose (49%), Pankreatitis (41%) und chronischer Hepatitis (35%), während Fälle mit M.Crohn oder Colitis ulcerosa normale BGP-Spiegel aufwiesen. Nach ROC-Analyse fanden sich unterschiedliche Diskriminanzschärfen gegenüber dem Normalkollektiv in absteigender Reihenfol-

ge für Gruppe 1 (prim.bil.Zirrhose, akute Hepatitis: $\chi^2=222$), Gruppe 2 (Gallenwegs-Ca, prim.Leberzell-Ca: $\chi^2=144$), Gruppe 3 (Colon-Ca, Pankreas-Ca, Lebermet.: $\chi^2=123$) und Gruppe 4 (Pankreatitis, chron. Hepatitis, Leberzirrhose: $\chi^2=69$). Im Vergleich zu den anderen Laborparametern (CEA, AFP, γ -Gt, aP, Bilirubin) ergab sich keine Korrelation zwischen BGP und AFP sowie Bilirubin, für viele Gruppen auch nicht zum CEA bis auf Colon- und Pankreaskarzinom (r_s zw. 0,342 und 0,594) wegen häufig hoher CEA-Spiegel und zur aP bis auf prim. Leberzell-Ca ($r_s=0,508$) und Pankreaskarzinom ($r_s=0,699$), während die beste Korrelation zur γ -Gt für Leberzirrhose, prim.Leberzellkarzinom, Colon- und Pankreaskarzinom (r_s zwischen 0,566 und 0,734, p 0,001 - 0,02) gefunden wurde.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit werden die erhobenen Befunde mit den Ergebnissen der Erstuntersucher verglichen und kritisch analysiert. Ferner wird die Rolle von BGP als Cholestaseparameter im Vergleich zu den etablierten Cholestaseparametern (γ -Gt, aP, LAP, Lipoprotein-X) sowie zum IgA und Prokolagen III diskutiert. Aufgrund der erhobenen eigenen Befunde und immunhistologischer Fremduntersuchungen mit dem hergestellten Anti-BGP-Serum wird eine duale Bedeutung von BGP als allgemeiner Cholestaseparameter (BGP als leber/gallepflichtiges Serumprotein von möglichem normalen Colon-Ursprung) und als onkofetales Differenzierungsantigen angenommen.

1. ABUHARFEIL, N. F. GRUNERT and S. v. KLEIST:
Non-specific crossreacting antigen (NCA) does not
contain methionine.
Tumour Biology 5 :339-350 (1984)
2. BRADFORD, M. M.:
A rapid and sensitive method for the quantitation
of microgram quantities of protein utilizing the
principle of protein-dye binding.
Analytical biochemistry 72: 248-254 (1976)
3. BRANDTZAEG, P.:
Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin
components: differential localization of free and
bound SC in secretory epithelial cells.
J. Immunol. 112: 1553-1564 (1974)
4. BUCHEGGER, F., M. SCHREYER, S. CARREL and J. P. MACH:
Monoclonal antibodies identify a CEA crossreacting
antigen of 95 kD (NCA-95) distinct in antigenicity
and tissue distribution from the previously descri-
bed NCA of 55 kD.
Int. J. Canc. 33(5): 643-649 (1984)
5. BURTIN, P.:
The carcinoembryonic antigen of the digestive system
(CEA) and the antigens cross-reacting with it.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 129 C:185-198 (1978)

6. BURTIN,P., G.CHAVANEL and H.HIRSCH-MARIE:
Characterization of a second normal antigen that
crossreacts with CEA.
J.Immunol.111: 1926-1928 (1973)
7. BURTIN,P., P.Q.QUAN and M.C.SABINE:
Non-specific crossreacting antigen as a marker
for human polymorphs, macrophages and monocytes.
Nature 255: 714-716 (1975)
8. BURTIN,P., M.C.SABINE and G.CHAVANEL:
Comparative study of the localization of CEA and
NCA₂ in cancerous and normal gastrointestinal
tissues.
Int.J.Canc. 19: 634-641 (1977)
9. CHANDY,K.G., S.G.HUBSCHER, E.ELIAS, J.BERG, M.KHAN
and D.BURWETT:
Dual role of the liver in regulating circulating
polymeric IgA in man: studies on patients with
liver disease.
Clin.Exp.Immunol. 52: 207-218 (1983)
10. COLIGAN,J.E., J.T.LAUTENSCHLÄGER, M.L.EGAN
and C.W.TODD:
Isolation and characterization of carcinoembryonic
antigen.
Immunochem. 10: 377 (1972)
11. COLIGAN,J.E., D.G.PRITCHARD, W.C.SCHNUTE
and C.W.TODD:
Cancer research 36: 1915-1917 (1976)

12. CRAIG, S.S., R.KULHAVY, S.J.PRINCE and J.MESTECKY:
Secretory component on epithelial cells is a
surface receptor for polymeric immunoglobulins.
J.Exp.Med. 147: 1832-1837 (1978)
13. DELACROIX, D.L., H.J.HADGSON, A.McPHERSON, C.DIVE
and J.P.VAERMAN:
Selective transport of polymeric immunoglobulin-A
in bile-quantitative relationships of monomeric
and polymeric immunoglobulin-A, immunoglobulin-M,
and other proteins in serum, bile and saliva.
J.Clin.Invest. 70: 230 (1982)
14. DENK, H., G.TAPPEINER, R.ECKERSDORFER and J.H.HOLZNER:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal
and extragastrointestinal tumors and its relationship
to tumor-cell differentiation.
Int.J.Cancer 10: 262 (1972)
15. DIVE, CH. and J.F.HEREMANS:
Nature and origin of the proteins in bile.
I. A comparative analysis of serum and bile
proteins in man.
Eur.J.Clin.Invest.4: 235-239 (1974)
16. DIVE, CH., RA.NADALINI, J.-P.VAERMAN et al.:
Origin and nature of the proteins in bile.
II. A comparative analysis of serum, hepatic
lymph and bile proteins in the dog.
Eur.J.Clin.Invest.4: 241-246 (1974)

17. ENGVALL, E., J.E. SHIVELEY and M. WRANN:
Isolation and characterization of the normal crossreacting antigen: homology of the NH₂-terminal amino acid sequence with that of carcinoembryonic antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1670-1674 (1978)
18. EPSTEIN, E., F. KIECHLE and B. ZAK:
Use of alkaline phosphatase isoenzyme analysis in the evaluation of cholestatic liver disease.
Ann. Clin. Lab. Sci. 14, 4 (1984)
19. FARRIS, M.A., K.G. CHANDY, K. ASDOWN, E. ELIAS and D. BURNETT:
Serum secretory component: a potential marker of biliary obstruction.
Clin. Chim. Acta 133: 165 (1983)
20. FORKER, E.L.:
Mechanisms of hepatic bile formation.
Ann. Rev. Physiol. 39: 323-347 (1977)
21. FREI, A., A. ZIMMERMANN und K. WEIGAND:
Prokollagen-III-Peptid im Serum als Ausdruck der Leberfibrose: morphometrisches Korrelat.
Schweiz. med. Wschr. 113, No. 15, 579-590 (1983)
22. FRENOY, N. and P. BURTIN:
Non-specific crossreacting antigen serum concentration in myeloid leukemias.
Clin. Chim. Acta 103: 23-31 (1980)

23. GADLER, H., K. BREMME and B. WAHREN:
Distribution of tumor-associated antigen CEA
and crossreacting NCA in fetal organs.
Int.J.Canc. 25: 91-94 (1980)
24. GODFREY, P. P., M. J. WARNER and R. COLEMAN:
Enzymes and proteins in bile. Variations in
output in rat cannula bile during and after
depletion of the bile-salt pool.
Biochem.J. 196: 11-16 (1981)
25. GOLD, P. and S. O. FREEDMAN:
Specific carcinoembryonic antigens of the human
digestive system.
J.exp.Med. 122: 467 (1965)
26. GOLDENBERG, D. M., R. M. SHARKEY and F. J. PRIMUS:
Immunocytochemical detection of carcinoembryonic
antigen in conventional histopathology specimens.
Cancer 42: 1546-1553 (1973)
27. GRABAR, P. and C. A. WILLIAMS:
Methode permettant l'etude conjuguee des proprietes
electrophoretiques et immunochemiques d'un melange
de proteines, application au serum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 10: 193 (1953)
28. HAMMARSTRÖM, S., T. SVENBERG, A. HEDIN and G. SUNDBLAD:
Antigens related to carcinoembryonic antigen.
Scand.J.Immunol. 7: Suppl. 6: 33 (1978)
29. HIJMANS, W., H. R. SCHUTT and F. KLEIN:
An immunofluorescence procedure for the detection
of intracellular immunoglobulins.
Clin.Exp.Immunol. 4: 457 (1969)

30. HOLAN, KR., RT. HOLZBACH, and RE. HERMANN :
Nucleation time: A key factor in the pathogenesis
of cholesterol gallstone disease.
Gastroenterology 77: 611-617 (1979)
31. HUITRIC, E., R. LOMMONIER, P. BURTIN, S. v. KLEIST and
G. CHAVANEL:
An optical and ultrastructural study of the
localization of carcinoembryonic antigen (CEA)
in normal and cancerous human rectocolonic mucosa.
Lab. Invest. 34: 97-107 (1976)
32. HUNTER, W. M.:
Radioimmunoassay.
aus WEIR, D. M.: Handbook of experimental immunology,
2nd Ed., Kap. 17, Publ. Blackwell
Scientific Publ. Oxford/London/Edinburgh/Melbourne 1973
33. KESSLER, M. J., J. E. SHIVELEY, D. G. PRITCHARD and
C. W. TODD:
Isolation, immunological characterizations and
structural studies of a tumor antigen related to
carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 38: 1041-1048 (1978)
34. KHOO, S. K., N. L. WARNER, J. T. LIE and I. R. MACKAY:
Carcinoembryonic antigenic activity of tissue
extracts: a quantitative study of malignant and
benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult
and fetal organs.
Int. J. Cancer 11: 681 (1973)
35. KLEIST, S. v.:
Substances immunologically related to CEA.
Ann. Immunol. (Inst. Past.) 124 C: 589 (1973)

36. KLEIST, S.v. and P.BURTIN:
Antigens cross-reacting with CEA.
R.B.HERBERMAN and K.R.McINTIRE (Ed.)
Immundiagnosis of cancer, M.DEKKER Inc.
N.Y.Basel 1979, 322-342
37. KLEIST, S.v., G.CHAVANEL and P.BURTIN:
Identification of an antigen from normal
human tissue that crossreacts with the
carcinoembryonic antigen.
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 69:2492 (1972)
38. KLEIST, S.v. and P.BURTIN:
Localisation cellulaire d'un antigene
embryonnaire de tumeurs coliques humaines.
Int.J.Cancer 4: 874-879 (1969)
39. KLEIST, S.v., M.KING and P.BURTIN:
Characterization of a normal tissular antigen
extracted from human colonic tumors.
Immunochem. 11: 249 (1974)
40. KLEIST, S.v., S.TROUPEL, M.KINK and P.BURTIN:
Determination of levels of carcinoembryonic
antigen and nonspecific cross-reacting antigen
in the sera of neonatal infants: brief communication
J.Natl.Canc.Inst. 59: 1621-1623 (1977)
41. KONOMI, H., J.SANO and Y.NAGAI:
Immunohistochemical localization of type I, III
and IV (basement membrane) collagens in the liver.
Acta Pathol.Jpn. 31: 973 (1981)

42. KRUPEY, J., P. GOLD and S. O. FREEDMAN:
Physicochemical studies of the carcinoembryonic
antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 128: 387 (1968)
43. KUROKI, M., Y. KOGA and Y. MATSUOKA:
Purification and characterization of carcinoembryonic
antigen-related antigens in normal adult feces.
Cancer Res. 41: 713-720 (1981)
44. KUROKI, M., T. SHINODA, T. TAKAYASU, Y. KOGA and
Y. MATSUOKA:
Immunological characterization and structural studies
of normal fecal antigen-1 related to carcinoembryonic
antigen.
Mol. Immunol. 19: 389-406 (1982)
45. KUTTEH, W., S. J. PRINCE, J. O. PHILLIPS, J. G. SPENNEY
and J. MESTECKY:
Properties of immunoglobulin A in serum of
individuals with liver diseases and in hepatic bile.
Gastroenterology 82: 184-193 (1982)
46. LAMERZ, R., CH. REISCHLE, P. STIEBER and B. WIEBECKE:
Occurrence of biliary glycoprotein-like antigen
(BGP I) in normal and adult, inflammatory and
cancerous tissues.
(Representation at the XIIIth. Ann. Meeting of
the Int. Soc. Oncodev. Biol. Med., Paris, 10.-13. sept.
1985)
Tumour Biol. 6: 326 (1985)

47. LAYDEN, T.J., E. ELIAS and J.L. BOYER:
Bile formation in the rat. The role of the para-cellular shunt pathway.
J.Clin.Invest. 62: 1375 (1978)
48. LEMAITRE-COELHO, I., G.D.F. JACKSON and J.P. VAERMAN:
High levels of secretory IgA and free secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction.
J.Exp.Med. 147: 934-939 (1978)
49. MACH, J.P. and G. PUSZTASZERI:
Carcinoembryonic antigen (CEA): demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein.
Immunochem. 9: 1031 (1972)
50. MATSUOKA, Y., M. KUROKI, Y. KOGA, H. KURIYAMA, T. MORI and G. KOSAKI:
Immunochemical differences among carcinoembryonic antigen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces.
Cancer Res. 42: 2012 (1982)
51. MAYR, K.:
Der Wert des Nachweises von Lipoprotein-X zur Feststellung einer Cholestase.
Dtsch.med.Wschr. 100: 2193 (1975)

52. MITROU,G., S.MERLE, J.-M.WDOWINSKI, L.THOMAS,
W.H.SIEDE and U.B.SEIFFERT:
Positives Lipoprotein X. Bewertung zu cholestase-
anzeigenden Enzymen und laborchemischen Parametern
der Fettstoffwechselstörung im Verlauf der akuten
Hepatitis.
Med.Welt 31: 947 (1980)

53. NAFTALIN,L., V.J.CHILD, D.A.MORLEY and D.A.SMITH:
Observations on the site of origin of serum
 γ -glutamyl transpeptidase
Clin.Chim.Acta 26: 297-300 (1969)

54. NAGURA,H., P.D.SMITH, P.K.NAKANE and W.R.BROWN:
IgA in human bile and liver.
J.Immunol. 126: 587-595 (1981)

55. NEVILLE,A.M., R.NERY, R.R.HALL, C.TUBERVILLE and
D.J.R.LAURENCE:
Aspects of the structure and clinical role of the
carcinoembryonic antigen (CEA) and related macro-
molecules with particular reference to urothelial
carcinoma.
Br.J.Cancer 28: Suppl.I.: 198 (1973)

56. NISHIMURA,M. and R.TESCHKE:
Alcohol and Gamma-Glutamyltransferase.
Klin.Wochenschr. 61: 265-275 (1983)

57. OUCHTERLONY,Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological
analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)

58. PATTENGAL, PK., CR.TAYLOR, E.ENGVAL and E.RUOSLAHTI:
Direct tissue visualization of normal crossreacting antigen in neoplastic granulocytes.
Am.J.Clin.-Pathol. 73: 351-355 (1980)
59. PAUMGARTNER, G.:
Physiology of bile secretion: bile acid dependant flow.
Liver and bile (Ed.) Bianchi, R., W.Gerok and K.Sickinger, pp.45-53, Lancaster: MTP (1977)
60. PRIMUS, F.J., J.W.FREEMAN and D.M.GOLDENBERG:
Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: purification from meconium of an antigen related to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 43: 679-685 (1983)
61. PUSZTASZERI, G., J.P.MACH et M.DYSLI:
Demonstration de determinants antigeniques communs entre l'antigene carcinoembryonnaire digestive et une glycoproteine extraite des tissus normaux.
Schweiz.med.Wschr.102: 1157 (1972)
62. RAEDSCH, R., A.STIEHL, A.SIEG, S.WALKER and B.KOMMERELL:
Biliary excretion of procollagen type III peptide in healthy human and in patients with alcoholic cirrhosis of the liver.
Gastroenterol. 85(6): 1265 (1983)

63. REICHEN, J. and G. PAUMGARTNER:
Excretory function of the liver.
Liver and biliary tract physiology.
I. International review of physiology 21
(Ed.) Javitt, N.B., pp. 103-150. Baltimore:
University Park Press (1981)
64. REISCHLE, CH.: Dissertationsarbeit
65. REUBEN, A.:
Biliary proteins.
Hepatology, Vol. 4, No. 5, pp. 46S-50S (1984)
66. RODBARD, D., W. BRIDSON and P. L. RAYFORD:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med. 74: 770-778 (1969)
67. ROGERS, G. T.:
Carcinoembryonic antigens and related glycoproteins.
Biochim. Biophys. Acta 695: 227-249 (1983)
68. ROHDE, H., L. VARGAS, E. HAHN, H. KALBFLEISCH,
M. BRUGUESA and R. TIMPEL:
Radioimmunoassay for type III procollagen peptide
and application to human liver disease.
Europ. J. Clin. Invest. 9: 451-459 (1978)
69. ROSALKI, S. B., T. TARLOW and D. RAU:
Plasma gamma-glutamyl transpeptidase elevation
in patients receiving enzyme-inducing drugs.
Lancet II: 376-377 (1971)

70. SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
1973
71. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules
and ions.
N.Y.Acad.Sci. 51: 660 (1949)
72. SCHEIDEGGER, J.J.:
Une micro-methode de l'immuno-electrophorese.
Int.Arch.Allergy 7: 103 (1955)
73. SCHMIDT, E.:
γ-GT-Erhöhung.
DMW 108.Jg., Nr.2, S.73 (1983)
74. SVENBERG, T.:
Carcinoembryonic antigen-like substances of human
bile. Isolation and partial characterization.
Int.J.Cancer 17: 588-596 (1976)
75. SVENBERG, T., S.HAMMARSTRÖM and A.HEDIN:
Purification and properties of biliary glyco-
protein I (BGP I). Immunochemical relationship
to carcinoembryonic antigen.
Mol.Immunol.16: 245-252
76. SVENBERG, T., S.HAMMARSTRÖM and J.ZEROMSKI:
Immunofluorescence studies on the occurrence and
localization of the CEA-related biliary glyco-
protein I (BGP I) in normal human gastro-
intestinal tissues.
Clin.Exp.Immunol. 36: 436 (1979)

77. SVENBERG, T., B. WAHREN and S. HAMMARSTRÖM:
Elevated serum levels of a biliary glycoprotein
(BGP I) in patients with liver or biliary tract
disease.
Clin. Exp. Immunol. 36: 317-325 (1979)
78. SVENBERG, T., S. HAMMARSTRÖM, G. ANDERSSON, C. JOHANSSON,
K. SAMUELSON and B. WAHREN:
Serum level of biliary glycoprotein I, as a
determinant of cholestasis, of similar use as
 γ -glutamyltranspeptidase.
Scand. J. Gastroenterol. 16: 817-824 (1981)
79. SZASZ, G.:
 γ -Glutamyltranspeptidase, in H. U. BERGMAYER (Ed.)
Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim 1974, S. 759
80. TALAVANT, E. and J. TOVAREK:
Enzymatic determination of lipoprotein-X,
a specific serum cholestasis marker.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19: 155 (1981)
81. TERRY, N. D., P. A. HENKART, J. E. COLIGAN and C. W. TODD:
Carcinoembryonic antigen: characterization and
clinical applications.
Transplant. Rev. 20: 100 (1974)
82. TERRY, W. D., P. A. HENKART, J. E. COLIGAN and C. W. TODD:
Structural studies of the major glycoproteins in
preparations with carcinoembryonic antigen activity.
J. Exp. Med. 136: 200 (1972)

83. THOMAS, P.:
Studies on the mechanisms of biliary excretion
of circulating glycoproteins.
Biochem.J. 192: 837-843 (1980)
84. THOMAS, P. and DA. HEMS:
The hepatic clearance of circulating carcinoembryonic
antigen and asialo-carcinoembryonic antigen by the rat.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 67: 1205-1209 (1975)
85. THOMAS, P. and N. ZAMCHECK:
Role of the liver in clearance and excretion of
circulating carcinoembryonic antigen (CEA).
Dig.Dis.Sci. 29: 216-224 (1983)
86. THOMAS, P., CA. TOTH and H. ZAMCHECK:
The mechanism of biliary excretion of α_1 -
acid glycoprotein in the rat: evidence for a molecular
weight dependant, non receptor-mediated pathway.
Hepatology 2: 800-803 (1982)
87. THOMSON, D.M.P., J. KRUPPEY, S.O. FREEDMAN and P. GOLD:
The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic
antigen of the human digestive system.
Proc.Nat.Acad.Sci. 64: 161 (1969)
88. TODD, C.W. and J.E. SHIVELEY:
Glycoproteins Glycolipids Dis. Processes 19, 342-356
(1987)
89. TURNER, D.A.:
An intuitive approach to receiver operating
characteristic curve analysis.
J.Nucl.Med. 19: 213-220 (1978)

90. VIOT, M., A. THYSS, G. VIOT, A. RAMAIOLOI, P. CAMBON, M. SCHNEIDER and C. M. LALANNE:
Comparative study of gamma glutamyl transferase, alkaline phosphatase and its alpha₁ isoenzyme as biological indicators of liver metastases.
Clin. Chim. Acta 115: 349-358 (1981)
91. WAGENER, C., P. PETZOLD, W. KÜHLER and V. TOTOVIC:
Binding of five monoclonal anti-CEA-antibodies with different epitope specificities to various carcinoma tissues.
Int. J. Cancer 33: 469-475 (1984)
92. WAHREN, B., G. GAHRTON, U. RUDEN and S. HAMMARSTRÖM:
Clinical evaluation of NCA in patients with chronic myelocytic leukemia.
Int. J. Canc. 29: 133-137 (1982)
93. WEBER, H.:
Die Bedeutung der Leucin-Aminopeptidase.
Dtsch. med. Wschr. 94: 181 (1968)
94. WEISSHAAR, D., E. GOSSRAU and B. FADERL:
Normbereiche von a-HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substratoptimierten Testansätzen.
Med. Welt 26: 387 (1975)
95. WICK, G., H. BRUNNER, E. PENNER and R. TIMPL:
The diagnostic application of specific antiprocollagen sera. II. Analysis of liver biopsies.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 56: 316-324 (1978)

Die vorliegende Arbeit wurde in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor Prof.Dr.med.G. Paumgartner) durchgeführt.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten in dieser Klinik sowie für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. R. Lamerz für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung während der Arbeit bedanken.

Durch seine Anleitung zum selbstständigen experimentellen Arbeiten und seine stete Bereitschaft zur Diskussion über Inhalt und Aussagekraft der Experimente sowie seine hilfreichen Ratschläge bei der Dokumentation der Ergebnisse hat Herr Prof. Lamerz einen großen Beitrag zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung geleistet.

Herrn Prof. Dr. G. Heberer als Chefarzt der chirurgischen Klinik am Klinikum Großhadern sowie Herrn Prof. Dr. Witte möchte ich für die Überlassung der zahlreichen Galleproben danken.

Für ihre stets zuverlässige Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Brandt und Fräulein Segura herzlich bedanken.

NAME: Petra Stieber

GEB.: 08.08.1954 in München

SCHULBILDUNG: 1961-65 Grundschule Eichenau / Fürstenfeldbruck
1965-68 Elsa-Brandström-Gymnasium München
1968-70 Internat Schloß Neubeuern / Inn
1970-75 Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck

BERUFSAUSBILDUNG: 1975-77 Studium der Naturwissenschaften
Universite Claude Bernard Lyon

1977-80 Studium der Humanmedizin
Gesamthochschule Essen

1980-82 Studium der Humanmedizin
LMU München

1982-83 Praktisches Jahr, LMU München,
Klinikum Großhadern:
- Institut für Anästhesiologie
- Medizinische Klinik II
- Chirurgische Klinik

25.10.83 Ärztliche Prüfung

1.7.84 Assistenzärztin am Institut für
Klinische Chemie, Klinikum Großhadern

